

SÉRIE A, N° 3805

N° D'ORDRE :

4656

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE Grade DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Françoise ARTZET

2

1^{re} THÈSE. —

« Recherches sur les antigènes viraux fixant
le complément. Etude des virus herpétique
et poliomyélitique »

2^e THÈSE. —

« Propositions données par la Faculté »

Soutenues le

14 DEC 1961

devant la Commission d'examen.

MM.

THOMAS

Président.

SOULAIRAC

BARRAUD

{ Examineurs.

SÉRIE A, N° 3805

N° D'ORDRE :

4656

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE Grade DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Françoise ARTZET

1^{re} THÈSE. — *« Recherches sur les antigènes viraux fixant le complément. Etude des virus herpétique et poliomyélitique »*

2^e THÈSE. — *« Propositions données par la Faculté »*

Soutenues le

devant la Commission d'examen.

MM.

THOMAS

Président.

SOULAIRAC

BARRAUD

} *Examineurs.*



(Janvier 1961)

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen ZAMANSKY

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure
DE BROGLIE	T Théories physiques
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées
PERES	T Mécanique des fluides et applications
BOURCART	T Géographie physique et Géologie dynamique
PLANTEFOL	T Botanique
GRASSE	T Evolution des êtres organisés
PREVOST	T Chimie organique
BOULIGAND	T Analyse appliquée à la Géométrie
CHAUDRON	T Chimie appliquée
WYART	T Minéralogie et Cristallographie
TEISSIER	T Zoologie
MANGENOT	T Biologie végétale (Orsay)
AUGER	T Physique quantique et Relativité
MONNIER	T Physiologie des Fonctions
PIVETEAU	T Paléontologie
ROCARD	T Physique (E.N.S.)
CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T Chimie Générale
FAVARD	T Géométrie supérieure
COULOMB	T Physique du Globe
Mlle COUSIN	T Biologie
CHRETIEN	T Chimie minérale
DRACH	T Zoologie
KASTLER	T Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T Génétique
RIVIERE	T Géologie (Orsay)
GAUTHERET	T Biologie (P.C.B.)
LUCAS R.	T Recherches Physiques
THOMAS A.	T Biologie cellulaire
ARNULF	T Optique appliquée
MORAND	T Physique Enseignement
SOLEILLET	T Physique (P.C.B.)

FORTIER	T Mécanique expérimentale des Fluides
DANJON	T Astronomie
PETIT	T Biologie maritime
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique
GALLIEN	T Embryologie
EICHHORN	T Biologie Végétale (P.C.B.)
DE CUGNAC	T Biologie Végétale (S.P.C.N.)
Mlle CAUCHOIN	T Chimie Physique
THELLIER	T Physique du Globe
L'HERITIER	T Biologie Générale (Orsay)
GRIVET	T Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T Mécanique générale
DUBREIL	T Arithmétique et Théorie des Nombres
QUELET	T Chimie Organique
CAGNIARD	T Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T Chimie Macromoléculaire
CUVILLIER	T Micropaléontologie
JUNG	T Pétrographie
TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique
WIEMANN	T Chimie organique et structurale
JACQUINOT	T Spectroscopie (Orsay)
VASSY	T Physique de l'Atmosphère
DESTOUCHES	T Théories Physiques
PRUVOST	T Géologie
AMIEL	T Chimie des Solides
HOCART	T Minéralogie et Cristallographie
J.P. MATHIEU	T Recherches Physiques
COUTEAUX	T Biologie Animale (P.C.B.)
MAY	T Zoologie (Orsay)
CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie
FELDMANN	T Biologie Végétale (P,C,B,)
GUINIER	T Physique des Solides (Orsay)
JOST	T Physiologie comparée
FORTET	T Calcul des Probabilités
SCHWARTZ	T Calcul différentiel et intégral
CHOUARD	T Physiologie Végétale
MALAVARI	T Aviation (Technique Aéronautique)
BRELOT	T Calcul différentiel
NORMANT	T Synthèse organique générale
BNARD	T Chimie (E.N.S.C.P.)
BUVAT	T Botanique (E.N.S.)
DUGUE	T Statistiques Mathématiques
SOULAIRAC	T Psychophysiologie
ULRICH	T Physiologie Végétale (E.N.S.)
MARECHAL	T Optique théorique et Appliquée
KIRRMANN	T Théories Chimiques

CHADEFAUD	T Botanique
Mlle LE BRETON	T Physiologie
SALEM	T Mathématiques générales
LELONG	T Mathématiques générales
DEVILLERS	T Anatomie et Histologie comparées
EHRESMANN	T Topologie Algébrique
FRANCON	T Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T Géographie physique et Géologie dynamique
GODEMENT	T Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T Calcul des Probabilités
ROCH	T Géologie
SCHATZMAN	T Astrophysique
TERMIER	T Paléontologie stratigraphique
ZAMANSKY	T Mathématiques générales
LENNUIER	T Physique (P.C.B.)
RIZET	T Génétique (Orsay)
ROUTHIER	T Géologie appliquée
Mme TONNELAT	T Relativité
DIXMIER	T Mathématiques (M.P.C.)
SOUCHAY	T Chimie (P.C.B.)
AIGRAIN	T Electrotechnique générale
BRUSSET	Chimie minérale
M. LEVY	T Physique théorique des hautes Energies (Orsay)
Mme CHAIX	T Chimie biologique
Mme HUREL-PY	Biologie Végétale (P.C.B.)
PIAUX	T Chimie (S.P.C.N.)
BRUN	T Mécanique expérimentale des fluides
LEDERER	T Chimie biologique
Mme DUBREIL	T Mathématiques (Agrégée)
Mme LELONG	T Mathématiques (E.N.S.)
MELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.)
COTTE	T Physique (M.P.C.)
DUBOIS J.E.	T Chimie (M.P.C.)
LAMOTTE	T Zoologie (E.N.S.)
MICHEL André	T Chimie Minérale (Orsay)
OLMER	T Energétique générale
ROUAULT	T Physique
GAUTHIER	T Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T Chimie Physique
BROSSEL	T Physique atomique
BUSER	Biologie animale (P.C.B.)
CAMUS	Biologie végétale (P.C.B.)
CASTAING	T Physique (Orsay)
CURIEN	T Minéralogie et Cristallographie
MOYSE	T Physiologie végétale (Orsay)
PANNETIER	T Chimie (Orsay)

POSSOMPES	T Biologie Animale (P.C.B.)
PULLMANN	Chimie théorique
TEILLAC	T Physique Nucléaire et Radioactivité (Orsay)
TONNELAT	Biologie physico-chimique
VILLE	T Econométrie
WILLEMART	Chimie (P.C.B.)
DODE	T Chimie (Orsay)
FREYMANN	T Physique (S.P.C.N.)
GUINOCHET	T Biologie Végétale (Orsay)
ROLLET	T Chimie (P.C.B.)
Mlle JOSIEN	T Chimie (P.C.B.)
CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorique des groupes
ARNOULT	T Electronique (Orsay)
CHAPELLE	T Physique (Orsay)
DELANGE	T Mathématiques (Orsay)
DENY	T Mathématiques Générales (Orsay)
GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides
LUCAS G.	T Géologie
ALLARD	T Chimie Physique
BERTHELOT	T Physique Fondamentale des Hautes Energies (Orsay)
BRICARD	T Météorologie
Mme ALBE-FESSARD	Psychophysiologie
FRIEDEL	Physique des Solides (Orsay)
M. JULIA	Chimie Organique Structurale
LENDER	Biologie Animale (S.P.C.N.) (Orsay)
MAGAT	Physico-chimie des rayonnements
Mlle QUINTIN	T Electrochimie
MONOD	T Biochimie Cellulaire
BENOIT	T Physiologie Animale (Orsay)
DE POSSEL	T Analyse numérique
CHARLOT	T Chimie analytique
HAISSINSKY	T Radiochimie
LEMEE	T Physiologie (B.M.P.V.) (Orsay)
GUERIN	T Chimie (Orsay)
CHATELET M.	Chimie (P.C.B.)
JEAN	Physique (Orsay)
MATTLET	T Physique (Orsay)
MICHEL Louis	Physique théorique (Orsay)
RUMPF	Chimie (P.C.B.)
BERGERARD	Biologie Animale (S.P.C.N.) (Orsay)
BERTEIN	Electronique (Orsay)
BOUISSIERS	Chimie des Radioéléments (Orsay)
Mme COUTURE	Thermodynamique et Mécanique Physique
ELLENBERGER	Géologie appliquée
FRANC	Biologie Animale (P.C.B.)

SCHNELL	Botanique tropicale (Orsay)
STOLKOWSKI	Biologie Animale (P.C.B.)
ACHER	Chimie Biologique (Orsay)
BAUDOIN	Biologie
BEAUMONT	Biologie Animale
BLAMONT	Géophysique Ionosphère
BOURREAU	Biologie Végétale (S.P.C.N.) (Orsay)
CURIE D.	Physique (M.G.P.)
DURAND-DELGA	Géologie
FREON	Chimie Organique (Orsay)
HELLER	Physiologie végétale
TORTRAT	Calcul des Probabilités
CAILLEUX	Géologie (S.P.C.N.)
MAGNAN	T Physique (P.C.B.)
DAUDEL	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la physique nucléaire
Mlle FOURCROY	Biologie Végétale (S.P.C.N.)
BARRAUD	Physiologie Cellulaire
NOIROT	Evolution des êtres organisés
Mme FOURES-BRUHAT	T Mécanique Analytique et Mécanique céleste
Mlle VEIL	Physiologie Générale
LWOFF	T Microbiologie
SIESTRUNCK	T Mécanique physique et expérimentale
LACOMBE	T Métallurgie (Orsay)
BROCHARD	T Physique (P.C.B.) (Orsay)
CABANNES	T Mécanique générale
LESIEUR	T Mathématiques (M.P.C.) (Orsay)
MAZET	T Mécanique générale (Orsay)

Secrétaire Général **R. POUILLAIN**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MES PARENTS

A la mémoire de Mademoiselle Denise Quivy,
Docteur-ès-Sciences, Maître de recherches au C.N.R.S.
qui nous a guidée dans notre orientation scientifique,
en hommage de notre affectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Pierre LEPINE,
Chef du Service des Virus à l'Institut PASTEUR,
qui nous a accueillie dans son laboratoire et a bien voulu orienter
et diriger nos recherches, en témoignage de notre respectueux et
profond attachement.

A Monsieur J. André THOMAS,
Professeur à la Faculté des Sciences,
qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse et
a bien voulu nous guider de ses conseils,

En hommage respectueux.

A Monsieur SOULAIRAC,
Professeur à la Faculté des Sciences,

A Monsieur BARRAUD,
Professeur à la Faculté des Sciences,
qui ont bien voulu accepter de faire partie de notre Jury,
en témoignage de reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Sven GARD,
Chef du Virusinstitutionen, Karolinska Institutet, Stockholm,
en témoignage de gratitude pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à
notre travail et les conseils qu'il nous a bienveillamment prodigués.

A Monsieur Jean-Louis DELSAL,
Docteur-ès-Sciences, Chef de laboratoire à l'Institut PASTEUR,
en remerciement chaleureux pour le concours inestimable qu'il nous a
apporté pour toute une partie de ce travail.

A Mademoiselle Marie-Louise RYHINER,
A Mademoiselle Carmen JUNEAU,
pour leur aide efficace et sans défaillances,
avec nos remerciements et en témoignage de notre attachement.

A nos amis du service des Virus de l'Institut PASTEUR,
qui, tous, ont pris une part dans ce travail.

Au Service de Microphotographie de l'Institut PASTEUR.

SOMMAIRE

CHAPITRE I	1
INTRODUCTION ET HISTORIQUE	1
CHAPITRE II	5
DESCRIPTION ET ETUDE COMPAREE DES METHODES UTILISEES	5
I - MODE D'EXPRESSION DES TITRES INFECTIEUX	5
II - ANTIGENE HERPETIQUE	6
Souches de virus	6
Différents procédés de culture de virus et d'extraction du matériel antigénique correspondant	6
A. Culture du virus dans le cerveau de lapin	7
B. Culture du virus dans l'oeuf de poule embryonné	7
1.- Membranes chorio-allantoïques	8
2.- Liquides extraembryonnaires	10
3.- Sacs vitellins	11
4.- Embryons	11
C. Culture du virus en cultures cellulaires	11
1.- Conditions générales de culture	12
2.- Choix des cellules	13
3.- Obtention des cellules	13
4.- Mise en culture	15
5.- Source de virus	15
6.- Aspect des lésions	17
7.- Préparation de l'antigène	17

III - ANTIGENE POLIOMYELITIQUE	19
Culture du virus dans les cellules <i>in vitro</i>	19
1.- Cellules	19
2.- Virus	20
3.- Préparation de l'antigène	20
IV - CONSERVATION DES ANTIGENES	20
V - TECHNIQUES SEROLOGIQUES	21
A. Microréaction de fixation du complément	21
B. Réaction de fixation du complément en tubes	21
1.- Diluant	21
2.- Complément	22
3.- Hématies	22
4.- Sérum hémolytique	22
5.- Conduite de la réaction	23
6.- Titrage des antigènes	24
C. Sérums immuns	24
1.- Sérums herpétiques	24
2.- Sérums poliomyélitiques	25
D. Spécificité des résultats	26
1.- Sérums négatifs	26
2.- Antigènes témoins	26
VI - CONCLUSION	28

CHAPITRE III 31

EVOLUTION DANS LE TEMPS DES POUVOIRS INFECTIEUX ET ANTIGENIQUE 31

I - MODE OPERATOIRE 31

II - TAUX D'INFECTIOSITE CELLULAIRE 32

III - MODE D'EXPRESSION DES RESULTATS 34

IV - PRECISION DES TITRES INFECTIEUX 34

V - POUVOIR INFECTIEUX ET ANTIGENIQUE DU VIRUS HERPETIQUE	34
A. Sur cellules de rein de lapin	35
Expérience I	35
Expériences II à VII	36
B. Sur cellules KB	37
VI - POUVOIR INFECTIEUX ET ANTIGENIQUE DU VIRUS POLIOMYELITIQUE	38
Expériences I, III et IV	38
Expérience II	39
VII - DISCUSSION ET CONCLUSION	39
CHAPITRE IV	47
ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES PHYSIQUES, CHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES DE LA FRACTION ACTIVE DANS LA FIXATION DU COMPLEMENT	47
I - EXPERIENCES DE CENTRIFUGATION	47
A. Antigène herpétique	4
1 - Antigènes préparés sur membranes chorio-allantoïques	47
2 - Liquides allantoïques et amniotiques	48
3 - Antigènes préparés sur cultures cellulaires	48
B. Antigène poliomyélitique	51
II - ACTION DE LA TEMPERATURE	52
III - ACTION DE L'ETHER	53
IV - ACTION DU pH SUR LA STABILITE DE L'ACTIVITE ANTIGENIQUE	54
A. Antigène herpétique	54
B. Antigène poliomyélitique	55
V - ETUDES CHROMATOGRAPHIQUES	55
A. Antigène herpétique	56
B. Antigène poliomyélitique	57

VI - ACTION DU SULFATE D'AMMONIUM	58
VII - ACTION DE CERTAINES PROTEASES ET NUCLEASES	59
1.- Trypsine	59
2.- Pepsine	60
3.- Ribonucléase et désoxyribonucléase	60
VIII - ESSAI DE CARACTERISATION CHIMIQUE DE L'ANTI- GENE HERPETIQUE	61
1.- Caractérisation des protéines	61
2.- Caractérisation des sucres	62
IX - CARACTERES IMMUNOLOGIQUES	62
A. Antigène herpétique	62
1.- Pouvoir immunogène	62
2.- Pouvoir précipitant	63
B. Antigène poliomyélitique	63
X - CONCLUSION	63
 CHAPITRE V	 65
DISCUSSION GENERALE	65
 CHAPITRE VI	 75
CONCLUSION GENERALES	75

CHAPITRE I

INTRODUCTION ET HISTORIQUE

Le pouvoir d'autoreproduction des virus, leur plasticité et leur spécificité représentent les attributs essentiels de la matière vivante, et contribuent à les placer au centre même des problèmes dont se préoccupent les biologistes. D'autre part, leur parasitisme obligatoire impose l'étude des éléments manquant à leur autonomie; longtemps obstacle à l'extension de la virologie, il a entraîné l'application à celle-ci de la méthode des cultures cellulaires, qui permettait enfin une analyse, au niveau de la cellule, des interactions virus-cellule.

D'autres caractères des virus, tels leur filtrabilité et leur invisibilité, caractères du reste non absolus, ont aussi conduit - après avoir, à l'origine, entravé le développement de leur étude - à la mise au point de techniques riches en enseignements en particulier quant à leur nature particulière, que les travaux de d'Hérelle et de Borrel avaient mise en évidence, et quant à leur taille, que l'ultrafiltration et la microscopie électronique ont permis de préciser.

La manifestation la plus évidente d'un virus est son pouvoir pathogène, mais sa multiplication s'accompagne de l'élaboration de produits spécifiques, les antigènes, précipitants, hémagglutinants ou fixant le complément, qui contribuent à les identifier. Les antigènes ont, en outre, une valeur diagnostique irremplaçable en ce qu'ils permettent de déceler *in vitro* par des réactions rapides et relativement faciles, la présence des anticorps apparus à la suite de l'infection dans le sérum des individus atteints.

De plus, depuis les travaux que Hoyle a consacrés au virus grippal (73, 74), on accorde un intérêt croissant à une catégorie d'antigènes fixant le complément, plus petits que les virus qu'ils accompagnent (antigènes dits solubles), qui, pour certains pourraient représenter l'unité reproductrice de la particule virale, et pour d'autres, ne seraient que des sous-produits de la multiplication du virus.

Suivre l'évolution d'un des antigènes associés à un virus, c'est donc aussi suivre la multiplication de celui-ci, et ce peut même être, dans certains cas (production de virus incomplet, par exemple) la seule assurance que l'on ait de celle-ci.

Contrairement à un certain nombre de virus, les virus herpétique et poliomyélitique ne possèdent pas d'hémagglutinine, décelable tout-au-moins dans les conditions habituelles. La réaction décrite par Scott *et al.* (143) pour le virus herpétique est une réaction indirecte d'hémagglutination par un sérum immun du virus fixé au préalable sur des hématies tannées, et ne semble pas avoir reçu d'application pratique. Quant aux réactions de précipitation décrites pour le virus poliomyélitique (56, 88, 143), elles exigent des préparations virulentes concentrées et des immunsérums de titre élevé, et conviennent difficilement en l'état actuel des choses à un diagnostic de routine. Pour ces deux virus, à côté de la réaction de neutralisation, plus coûteuse et d'application plus difficile, la réaction de fixation du complément, par sa sensibilité, reste donc la plus importante au point de vue diagnostique (problèmes de l'herpès récurrent, de l'étiologie de certaines encéphalites ou méningites, du diagnostic rapide d'une maladie telle que la poliomyélite).

C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier, à côté de l'antigène responsable de la fixation du complément dans l'infection herpétique, auquel est consacrée la plus grande partie de ce travail, l'antigène poliomyélitique correspondant, bien qu'un certain nombre de caractères différencient les virus auxquels ils sont associés. En effet, avec un diamètre moyen de $27\text{ m}\mu$ (142), le virus poliomyélitique se range parmi les plus petits des virus connus, alors que le virus herpétique appartient à la classe des virus de taille moyenne [diamètre moyen $175\text{ m}\mu$ (22)]. D'autre part, les virus herpétiques opposent aux trois types immunologiques distincts des virus poliomyélitiques une relative homogénéité (58, 84), en dépit de quelques anomalies observées dans le comportement antigénique de certaines souches (82, 169). Libérés à des vitesses différentes comme le soulignent les études faites sur cellules isolées (101, 168), ces virus se propagent en outre selon des modes distincts: infection directe de cellule à cellule dans le cas du virus herpétique (152, 165), alors que pour le virus poliomyélitique, le passage intermédiaire par le milieu environnant est un stade préalable à l'infection des cellules voisines (15). Enfin les acides nucléiques qui entrent dans leur composition semblent bien devoir être dans le cas du virus herpétique du type désoxyribonucléique (111), et ribonucléique dans le cas du virus poliomyélitique (142).

Les difficultés rencontrées dans l'obtention, pour l'un et l'autre de ces virus, d'antigènes de valeur constante et de titre élevé nous obligeaient à reconsidérer le problème de leur préparation. Aussi indiquerons-nous tout d'abord, à côté des techniques générales utilisées, les étapes successives qui nous ont amenée à substituer les cellules en culture aux différents hôtes animaux initialement choisis pour la culture de ces virus. Nous décrirons les méthodes de préparation correspondant à chacune de ces étapes, qui reflètent l'évolution de la virologie de ces dernières années.

Dans le chapitre suivant, nous rendrons compte de l'étude évolutive que nous avons pratiquée sur cultures cellulaires et des résultats obtenus concernant la relation dans le temps de l'activité antigénique fixant le complément et du pouvoir infectieux de chacun des virus étudiés.

Nous examinerons au chapitre IV quelques-unes des propriétés de ces antigènes, celles tout-au-moins qu'il nous a été possible d'étudier, malgré les faibles quantités de matériel actif à notre disposition et, par contre, la masse importante de produits étrangers. En effet les faibles concentrations que la réaction de fixation du complément, par sa grande sensibilité, permet de déceler, sont souvent insuffisantes pour les exigences d'une analyse physique et chimique détaillée.

Nous indiquerons enfin les conclusions générales que nous pensons pouvoir tirer de cette étude, et ce qu'elles nous apportent quant à la nature de l'antigène fixant le complément et à sa place auprès de la particule virale.

CHAPITRE II

DESCRIPTION ET ETUDE COMPAREE DES METHODES UTILISEES

Nous décrirons ici les procédés d'obtention du matériel antigénique, et à cette occasion les méthodes de culture des virus herpétique et polio-myélitique, enfin les techniques sérologiques que nous avons utilisées. Mais auparavant nous indiquerons brièvement en quels termes nous avons exprimé les titres infectieux des virus étudiés.

I - MODE D'EXPRESSION DES TITRES INFECTIEUX

A côté des méthodes, désormais classiques, d'appréciation de la teneur en virus d'une suspension virulente, d'autres ont été décrites qui permettent une estimation directe du nombre de particules infectieuses, pour le virus herpétique par Burnet et Lush (23) (numération des lésions sur la membrane chorio-allantoïque de l'oeuf de poule embryonné), par Kaplan (83), Osterhout et Tamm (112), Waterson (163) et Farnham (45) (numération des plages provoquées par la croissance du virus sur un tapis cellulaire continu, en présence ou non de gélose), et pour le virus poliomyélitique par Dulbecco et Vogt (41). Guillot (59) a donné un exposé critique de la valeur comparée des titres obtenus par ces deux méthodes. Nous indiquerons seulement que nous avons jugé suffisante pour notre étude la précision des titres fournis par les titrages d'infectiosité habituels, qui tiennent compte de la réponse absolue ("tout ou rien") observée dans un groupe d'hôtes sensibles, animaux, oeufs ou cultures cellulaires, inoculés avec différentes dilutions (ici de progression géométrique de raison 10). Le titre du virus est alors exprimé en doses infectieuses 50 % (DI_{50}). Une DI_{50} est définie comme la dilution de virus qui doit être inoculée à un groupe d'animaux, d'oeufs ou de cultures de tissus pour donner une réponse positive chez 50 % d'entre eux (76). Elle est calculée selon la méthode de Reed et Muench (126). Le titre d'une suspension virulente est donc le nombre de DI_{50} rapporté à l'unité de volume, le ml, et qui peut être exprimé sous forme logarithmique ($\log_{10}$). C'est ce mode d'expression que nous avons adopté.

II - ANTIGENE HERPETIQUE

Souches de virus

Comme l'a mentionné Halonen (60), toutes les souches d'herpès ne semblent pas équivalentes quant à leur pouvoir antigénique éprouvé *in vitro* par la réaction de fixation du complément. Aussi nous a-t-il semblé intéressant, dans un but de sélection, d'examiner la valeur de plusieurs virus de différentes origines. Les conditions de leur adaptation et de leur entretien sont les suivantes :

- souche ¹⁰Bruxelles¹⁰, entretenue au Service des Virus de l'Institut Pasteur, où elle a subi plus de 100 passages consécutifs sur rongeurs, puis adaptée à la membrane chorio-allantoïque de l'oeuf de poule embryonné (36 passages).

- souche ¹⁰54-33¹⁰, isolée sur oeufs au Service des Virus à partir d'un prélèvement buccal pratiqué chez un enfant qui présentait une ¹⁰stomatite vésiculeuse érythémateuse¹⁰. Elle a ensuite été entretenue sur oeufs (60 passages), puis adaptée aux cellules de rein de lapin (30 passages).

- souche ¹⁰59-3055¹⁰, elle aussi isolée au laboratoire de diagnostics du Service des Virus à l'Institut Pasteur, à partir d'un cas de stomatite chez un enfant, mais directement cette fois sur cellules en culture, sur lesquelles elle a été exclusivement entretenue depuis (7 passages).

- souche ¹⁰Z¹⁰ de Gajdusek (50), isolée dans le Service de Pédiatrie de l'Ecole de médecine de Harvard, et qui nous a été aimablement transmise par Mr le Professeur R. Sohier de Lyon; entretenue dans le sac vitellin de l'oeuf de poule embryonné.

Au cours des chapitres suivants, nous préciserons dans chaque cas la souche que nous avons utilisée.

Différents procédés de culture du virus et d'extraction du matériel antigénique correspondant.

Les cellules en culture *in vitro* représentaient *a priori* le substrat de choix pour l'étude que nous nous proposons. Mais au moment où nous avons abordé cette étude, les techniques correspondantes étaient encore trop peu développées pour qu'elles puissent lui être directement appliquées. Aussi avons-nous à l'origine cultivé le virus *in vivo* sur différents hôtes animaux et essayé successivement des antigènes d'origines diverses, parmi lesquels nous avons été, par la suite, appelée à faire un choix en fonction de la qualité et du titre du matériel obtenu. Nous décrirons donc ici les différentes techniques que nous avons appliquées à la préparation de ces antigènes; chacune a ses caractéristiques, fonction en particulier de la nature du matériel d'origine d'où il fallait extraire l'antigène. Nous indiquerons enfin la méthode que nous avons mise au point sur culture cellulaire et

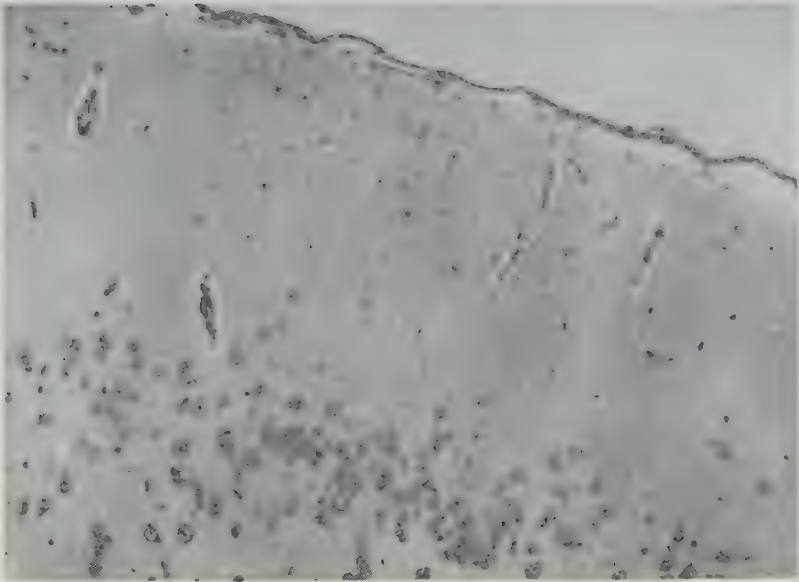


Fig. 1a - Cerveau de lapin normal
Hémalun-éosine. Gr. 135.



Fig. 1b - Cerveau de lapin infecté par le virus herpétique; méningite, manchons périvasculaires, neuronophagie, et, visibles dès ce grossissement, les lésions nucléaires spécifiques.
Hémalun-éosine. Gr. 135.

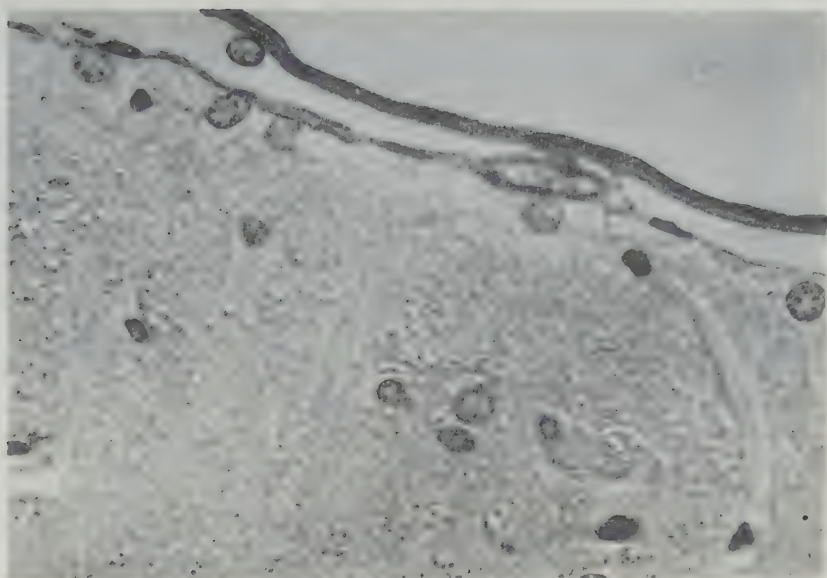


Fig. 2a - Cerveau de lapin normal
Hémalun-éosine . Gr. 610

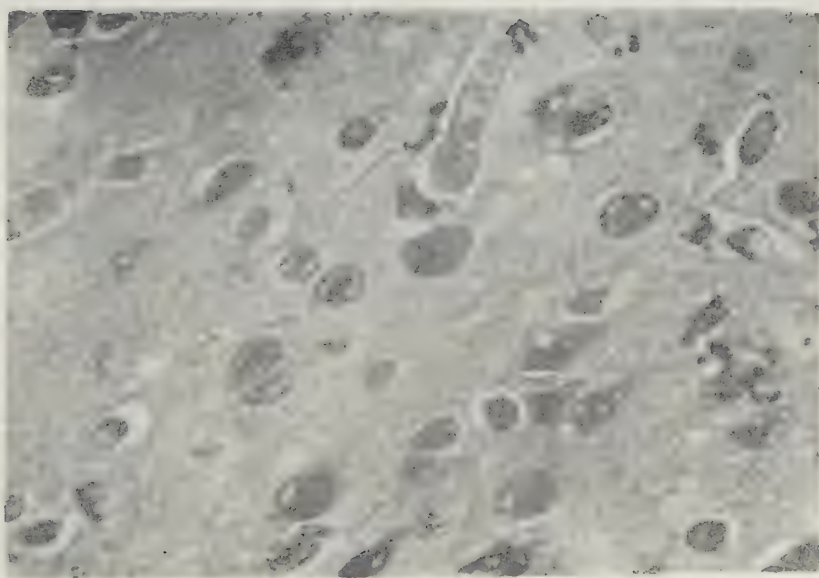


Fig. 2b - Cerveau de lapin infecté par le virus herpétique; différents stades d'atteinte nucléaire, altération et margination de la chromatine, inclusion intranucléaire. Hémalun-éosine. Gr. 610

qui est celle qui nous a fourni les antigènes les plus satisfaisants (absence de pouvoir anticomplémentaire, et titre plus élevé).

A. CULTURE DU VIRUS DANS LE CERVEAU DE LAPIN

Après inoculation intracérébrale (0,25 ml) d'une suspension virulente diluée à 10^{-1} de cerveau de lapin d'un passage précédent d'une souche neurotrope de virus herpétique, le lapin présente après un délai variable selon les souches (4 à 5 jours avec la souche "Bruxelles", 6 à 7 jours avec la souche "54-33") des signes d'encéphalite caractéristiques. Un fragment du cerveau est prélevé pour contrôle histopathologique de la spécificité des lésions (fig. 1 et 2, a et b). On peut extraire de la partie restante l'antigène qu'elle contient grâce à la méthode décrite par Casals (25), qui consiste à éliminer les lipides cérébraux dont le pouvoir anticomplémentaire génèrait la réaction, par des traitements successifs à l'acétone et à l'éther. Le matériel cérébral, finement broyé au mortier refroidi par exemple, est soumis à deux traitements successifs à l'acétone refroidie par séjour à -30° (20 ml pour 1 g de produit cérébral frais); ces traitements, séparés par une centrifugation à faible vitesse 1500 t/mn 5 mn, et un séjour 20 mn à la température du laboratoire, sont suivis par l'action d'un mélange à volumes égaux d'acétone et d'éther (mêmes proportions, mêmes temps). Enfin le résidu récupéré par centrifugation, extrait deux autres fois dans les mêmes conditions et les mêmes proportions à l'éther froid, est desséché sous vide, puis repris dans le tampon au véronal (3 ml pour 1 g de cerveau frais) et laissé la nuit à $+4^{\circ}$. Le lendemain, le matériel insoluble est éliminé par une dernière centrifugation à froid 10 000 t/mn 1 h (centrifugeuse angulaire "International"). Le surnageant, qui contient toutes les protéines solubles dans les conditions de l'expérience, constitue l'antigène.

Cette méthode, quelque peu laborieuse et dangereuse au stade pulvérisent des premières extractions, ne nous a fourni que des antigènes de qualité médiocre, dont on trouve un exemple dans le tableau I.

B CULTURE DU VIRUS DANS L'OEUF DE POULE EMBRYONNE

Avant l'extraordinaire essor des cultures cellulaires *in vitro*, la méthode de culture des virus dans l'oeuf embryonné est restée pendant des années l'une des plus généralement adoptées. Beveridge et Burnet ont donné en 1946 une revue générale des techniques utilisées (11, 12). Aussi ne décrivons-nous que brièvement celles que nous avons choisies; en donnant seulement quelques précisions sur les conditions dans lesquelles nous avons opéré.

L'âge des oeufs, fonction de la voie d'inoculation, varie avec la nature du matériel que l'on souhaite recueillir, oeufs de 10 jours pour inoculation

sur la membrane chorio-allantoïque (stade auquel elle est le plus développée), oeufs de 7 jours pour inoculation dans le sac vitellin et recueil des liquides allantoïque et amniotique, dans lesquels le virus aura le temps de se développer, avant que la réduction normale de leur volume au cours de l'évolution embryonnaire ne soit trop accentuée.

Les oeufs, que nous avons utilisés, proviennent de poules de race Leghorn.

L'incubation préalable à l'inoculation a lieu dans un incubateur dont la température est maintenue à 38°, alors que les oeufs inoculés sont conservés à 36°.

Le virus herpétique se développe bien dans les différents milieux de l'oeuf embryonné, et le choix de la voie d'inoculation et du matériel recueilli est fonction de la souche utilisée et des buts de l'expérience.

1. MEMBRANES CHORIO-ALLANTOIQUES

Dawson (38) dès 1933 a appliqué cette méthode, ensuite largement exploitée par Burnet et ses collaborateurs (24).

a - Stock de virus : une fois le virus adapté par un certain nombre de passages successifs sur la membrane chorio-allantoïque, et son titre jugé satisfaisant, nous avons constitué périodiquement des stocks de virus à partir desquels était dilué l'inoculum.

Un tel stock de virus consiste en une émulsion à 20 % de membranes chorio-allantoïques lésées, broyées au mortier préalablement refroidi à - 30°, et mises en suspension dans de l'eau physiologique additionnée de 10 % de sérum de lapin et d'antibiotiques (500 U.I. de pénicilline et 100 µg de streptomycine par ml). Après centrifugation à faible vitesse (2000 t/mn environ pendant 15 mn), le surnageant est réparti par 0,5 ml en tubes qui sont ensuite scellés et conservés congelés à - 70°.

Nous avons ainsi préparé, au cours de ce travail, cinq de ces stocks de virus, au 24°, 46°, 57°, 58° et 59° passage de la souche "54-33", dont les titres ont été respectivement 5,3, 5,8, 5,3, et 6,3 log DI₅₀.

b - Diluant : étant donné l'instabilité du virus herpétique, nous avons choisi pour les dilutions préalables à l'inoculation sur oeufs, le diluant, adopté pour la préparation du stock de virus, dans lequel la baisse de titre était la plus faible, c'est à dire l'eau physiologique (solution à 0,85 % de chlorure de sodium dans l'eau bidistillée) additionnée, comme nous l'avons indiqué plus haut, de sérum de lapin inactivé (10 %) et d'antibiotiques (500 U.I. de pénicilline et 100 µg de streptomycine par ml).

Tableau I - Antigènes herpétiques de différentes origines.
(à l'exception de ceux d'origine cellulaire)

Antigènes		Dilutions du sérum					Témoins antigènes
		8	16	32	64	128	
"Cerveau de lapin"							
1	4	4	4	3	2	0	
	2	2	1	0	0	0	
Normal	1	tr.	0	0	0	0	
"Membranes chorio-allantoïques"							
1	4	4	4	2	tr.	0	
	2	4	4	2	tr.	0	
	4	4	4	1	0	0	
	8	4	3	1	0	0	
McaN	1	0	0	0	0	0	
"Liquides allantoïques et amniotiques"							
1	4	4	2	tr.	0	0	
	2	4	4	tr.	0	0	
	4	4	2	0	0	0	
	8	1	tr.	0	0	0	
L A A N	1	0	0	0	0	0	
"Sacs vitellins"							
5	0	0	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	0	
Sv N	5	0	0	0	0	0	
"Embryons de poulets"							
1	4	4	3	2	tr.	0	
	2	4	4	1	tr.	0	
	4	3	2	tr.	0	0	
E P N	1	0	0	0	0	0	
Diluant		0	0	0	0	0	

Antigènes examinés par la micro-réaction de fixation du complément sur plaque, mentionnée dans le texte.

Sérum utilisé : sérum du lapin 635 (7^e échantillon) dont la courbe d'immunisation est donnée à la figure 12.

Antigènes témoins (normaux ou N) correspondant à chacune des catégories d'antigène, préparés selon la même technique que l'antigène spécifique.

Les dilutions des sérums et des antigènes sont exprimées par l'inverse du taux de dilution : 8, 16, etc..., sérum dilué au 1/8, 1/16, etc... ; 1, 2, etc..., antigène pur, dilué au 1/2, etc....

c - Dilution de l'inoculum : précisons tout d'abord, puisque comme l'ont souligné Sohier et ses collaborateurs (149), des divergences de technique entre laboratoires peuvent entraîner des variations non négligeables des titres infectieux, que les dilutions sont faites par transfert de la dilution la plus concentrée à la moins concentrée du volume choisi (mesuré entre deux traits) avec changement de pipette entre chaque dilution. Par contre, au moment de l'injection, une seule seringue est employée, mais, s'il y a des dilutions successives, les inoculations procèdent de la plus diluée à la plus concentrée.

Pour la préparation des antigènes, les oeufs reçoivent sur la membrane chorio-allantoïque 0,5 ml d'une dilution à 10^{-4} du virus conservé à -70° , ce qui, en fonction des titres indiqués plus haut, équivaut à un peu plus de 10 DI₅₀.

d - Mode d'inoculation : l'inoculum, préalablement dilué, est déposé sous un volume de 0,5 ml sur la partie de la membrane chorio-allantoïque qui limite la chambre à air artificiellement créée selon la technique préconisée par Beveridge et Burnet. L'orifice de la coquille est obturé par un rectangle de ruban adhésif transparent. Les oeufs, remis à l'étuve à 35° , sont mirés chaque jour (ceux qui seraient morts le lendemain de l'inoculation sont écartés), plusieurs fois par jour si on le juge utile, jusqu'au prélèvement.

L'émulsion d'inoculation estensemencée dans un bouillon de culture, pour contrôle de stérilité.

e - Prélèvement : au temps du prélèvement, choisi en fonction de la dilution de l'inoculum, le 5^e jour (96 h d'inoculation) dans les conditions d'inoculation indiquées, les membranes lésées sont recueillies de la manière suivante : on brise délicatement, autour de l'orifice initial, la coquille de l'oeuf, et on prélève avec pince et ciseaux la surface atteinte de la membrane ainsi dégagée.

f - Aspect des lésions : la membrane apparaît épaissie, et la partie, qui a été directement exposée à la suspension virulente, est recouverte de lésions confluentes qui lui confèrent un aspect blanchâtre et granuleux, surmonté parfois de vésicules translucides plus ou moins importantes. Après fixation au liquide de Bouin et coloration à l'hémalum-éosine, on constate, à l'examen microscopique, un épaississement de l'ectoderme, nécrosé et desquamé par endroits, avec dispersion, en particulier dans le mésoderme, de cellules inflammatoires (fig. 3 a et b). Dans les cellules ectodermiques les moins atteintes, on peut aisément reconnaître les altérations nucléaires caractéristiques de l'infection herpétique aux différents stades, margination de la chromatine et inclusions éosinophiles (fig. 4 a et b). Coriell *et al.* (33) ont donné une description détaillée de ces lésions.

g - *Préparation de l'antigène* : nous avons adopté la technique décrite par Dudgeon (40), et qui consiste à extraire par congélations - décongélations successives le contenu antigénique d'une suspension à 20 % de membranes chorio-allantoïques infectées.

Les membranes sont broyées au mortier refroidi et progressivement mises en émulsion dans le tampon au véronal de Mayer *et al.* (105), dont la formule est donnée dans le paragraphe consacré aux techniques sérologiques. Cette émulsion est alors congelée, décongelée six fois par passages rapides de - 40° environ à + 37°. Ce traitement provoque ainsi à la fois la libération du matériel antigénique à partir des cellules des membranes, et la précipitation d'une grande partie des lipoprotéines étrangères qui sont à l'origine du pouvoir anticomplémentaire souvent important des émulsions brutes. L'antigène est le surnageant de la centrifugation à 4500 t/mn pendant 1 h de cette émulsion. Le titre d'un tel antigène est donné dans le tableau I.

2 - LIQUIDES EXTRA-EMBRYONNAIRES

De nombreux auteurs [Fowler (48), Gajdusek (50), Hayward (64) et Sohler (149)] préférant à l'antigène-membranes¹¹ les liquides allantoïques et amniotiques, nous avons examiné le pouvoir antigénique de ces liquides.

Les souches "54-33"¹⁰ et "Z"¹⁰ ont été utilisées.

a - *Inoculum* : c'est, soit une émulsion de membranes chorio-allantoïques infectées (stock de virus) diluée à 10^{-3} , soit, après adaptation de la souche au sac vitellin, un mélange des liquides allantoïques et amniotiques eux-mêmes, non dilués.

b - *Voie d'inoculation* : grâce à un orifice pratiqué au-dessus de la chambre à air, l'inoculum (0,25 ml) est introduit directement dans le vitellus, ou avec la souche "Z"¹⁰ à la fois par cette voie et dans la cavité amiotique. Les oeufs sont remis à l'étuve à 37°, mirés deux fois par jour au moins (les morts du lendemain de l'inoculation sont écartés) et sacrifiés, si besoin est, par séjour à + 4°, de manière à éviter, au moment du prélèvement, de souiller les liquides par des hématies.

c - *Récolte* : elle a lieu entre le 3° et le 5° jour après l'inoculation. On écarte la calotte supérieure de l'oeuf, puis on recueille, par aspiration, les liquides allantoïque et amiotique. Ceux-ci sont mélangés, centrifugés à faible vitesse de manière à précipiter les débris cellulaires, et essayés par fixation du complément.

On trouvera dans le tableau I le titrage d'un tel mélange.

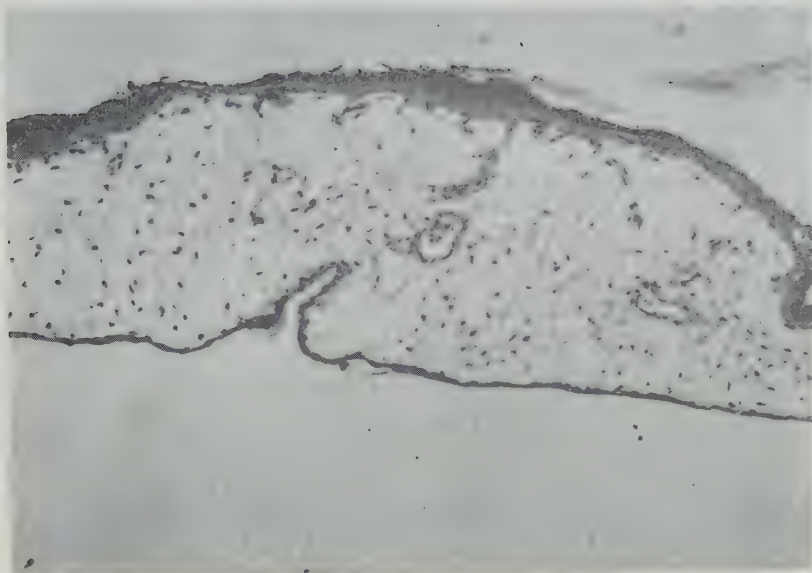


Fig. 3a - Membrane chorio-allantoïque normale
Hémalun-éosine. Gr. 135.

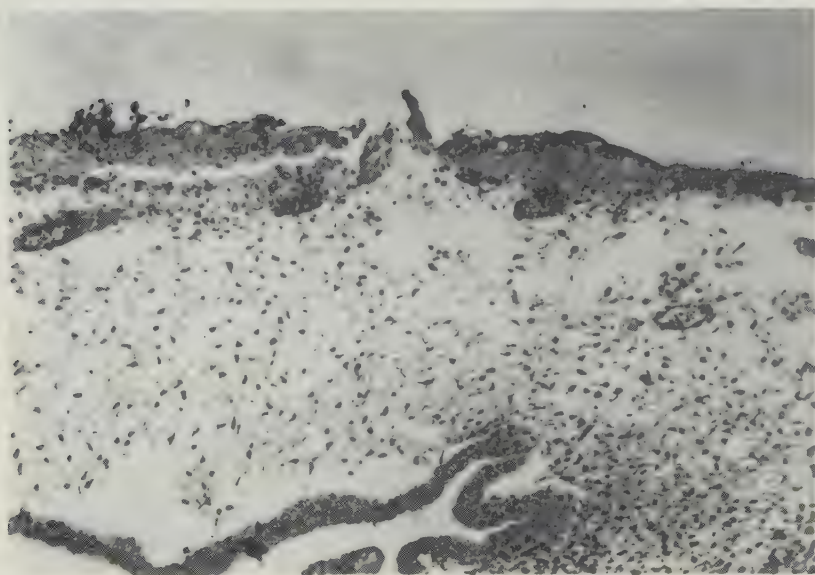


Fig. 3b - Membrane chorio-allantoïque infectée par le virus herpétique; épaissement et desquamation de l'ectoderme, cellules d'infiltration, et lésions nucléaires.
Hémalun-éosine. Gr. 135.

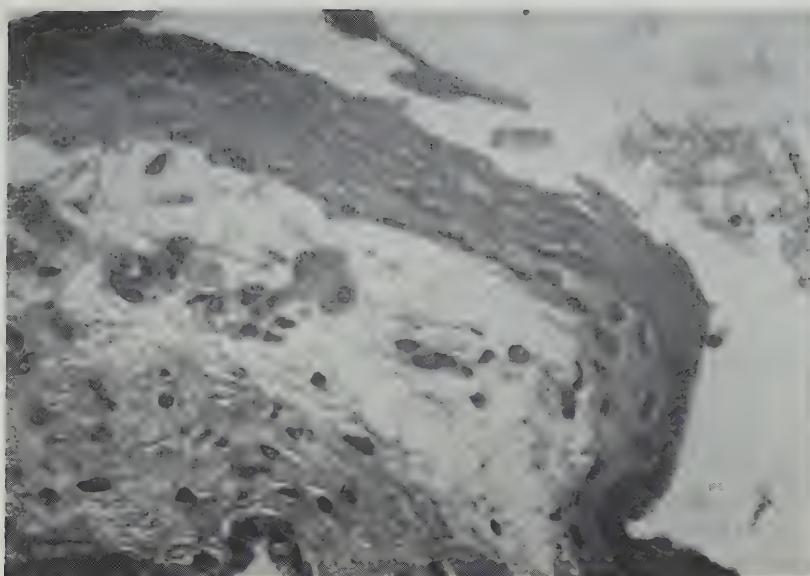


Fig. 4 - Membrane chorio-allantoïque normale.
Hémalun-éosine. Gr. 610.

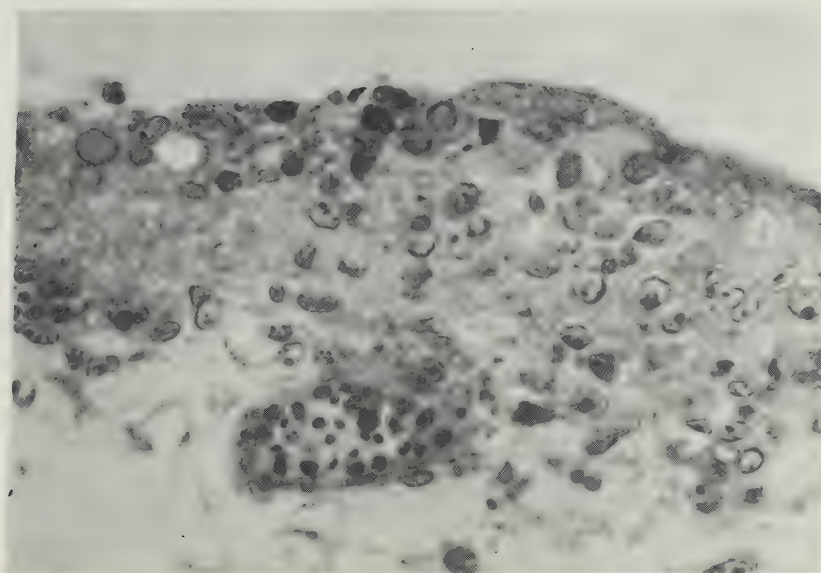


Fig. 4b - Membrane chorio-allantoïque infectée par le virus herpétique; noyaux atteints des cellules ectodermiques, quelques-uns avec inclusion.
Hémalun-éosine. Gr. 610.

3 - SACS VITELLINS DE L'EMBRYON DE POULET

Nous avons tenté d'adapter à la préparation de l'antigène herpétique la méthode décrite par Volkert et Christensen (162), qui fournit d'excellents antigènes pour les virus du groupe de la psittacose par extraction du matériel actif à l'éther et élimination des lipides étrangers par l'acétone à chaud.

Après inoculation directement dans le sac vitellin (0,25 ml) d'une émulsion de membranes chorio-allantoïques peu diluée, la mort de l'embryon survient en 3 à 4 jours. On recueille les sacs vitellins débarassés autant que possible du vitellus, et on ne conserve que ceux dont le frottis, traité selon la méthode d'imprégnation argentique de Morosow, révèle la présence de corps élémentaires de virus.

Des essais préliminaires nous ayant révélé la relative thermolabilité de l'antigène herpétique, nous avons supprimé l'ébullition préalable prescrite dans la méthode initiale, et nous avons fait agir sur l'extrait-éther l'acétone à froid. Dans ces conditions, ce second temps n'est pas assez efficace pour supprimer le pouvoir anticomplémentaire important, et aux dilutions où celui-ci devient négligeable, aucune activité antigénique n'est décelable; voir tableau I.

4 - EMBRYONS DE POULET

L'inoculation du virus herpétique dans l'oeuf de poule embryonné entraînant le plus souvent la généralisation de l'infection et la mort de l'embryon (5), nous avons envisagé de préparer un antigène à partir de l'embryon lui-même, qui, étant donné son poids, au regard des autres sources de virus, pourrait fournir des quantités importantes de matériel.

Les embryons, prélevés après la mort d'oeufs inoculés sur la membrane chorio-allantoïque, sont broyés au broyeur de Durel et Sausse, après quoi l'on fait une émulsion à 20 % dans le tampon au véronal, que l'on congèle cinq fois, et que l'on centrifuge 45 mn à 5.000 t. Le surnageant titré est de valeur médiocre. Tableau I.

C - CULTURE DU VIRUS DANS LES CELLULES IN VITRO

Nous avons cultivé le virus d'une part sur des cellules de première explantation, obtenues par trypsination d'organes, d'autre part sur des cellules dites de souche, cellules le plus souvent d'origine cancéreuse, entretenues en lignée continue. Ce sont les techniques se rapportant à ces deux catégories de cellules que nous décrivons ici.

1 - CONDITIONS GENERALES DE CULTURE

Avant de préciser la nature des cellules utilisées et les méthodes d'obtention correspondantes, nous indiquerons tout d'abord un certain nombre d'éléments communs aux différents modes de culture.

a - Solutions salines : pour le lavage des cellules avant ou après leur mise en culture, de même que pour les dilutions de virus avant l'inoculation, nous avons employé soit la solution de Hanks (62), soit la solution dite PBS ("phosphate buffer saline") (41), dont nous avons conservé les initiales anglo-saxonnes, étant donné l'usage qui en est fait dans de nombreux laboratoires. Leur composition est donnée dans le tableau II.

b - Trypsine : c'est une solution à 0,25 % de trypsine américaine de Mann ("Mann Research Laboratory"), dissoute dans la solution de Hanks, stérilisée par filtration sur bougie Chamberland L₃ et conservée à + 4° deux mois au plus.

c - Versène : (acide éthylène-diamine-tétracétique). On utilise en réalité le sel de sodium en solution à 0,02 % dans du PBS sans calcium ni magnésium, stérilisée par autoclavage à 105° pendant 20 mn.

d - Milieux de culture : nous avons utilisé le milieu à base d'hydrolysate de caséine de l'Institut Pasteur (96) dont la composition est donnée dans le tableau III.

Ce milieu est additionné, au moment de l'emploi, de bicarbonate (solution à 5,5 % contenant du rouge de phénol) en proportions variables en fonction du pH souhaité (pH 6,8 à la mise en culture, 7 au premier changement de milieu et 7,2 pour le milieu d'entretien), apprécié par comparaison avec une gamme-étalon. On lui ajoute également des antibiotiques (100 U.I. de pénicilline et 50 µg de streptomycine), et enfin, selon la nature des cellules et leur stade de développement, une quantité variable de sérum inactivé 30 mn à 56° : pour la mise en culture des cellules de reins de lapin, il s'agit de 7 % de sérum de veau et de 5 % de sérum de lapin; au premier changement de milieu (5 à 7 jours après), cette concentration est réduite à 10 % de sérum de veau. Ces teneurs du milieu en sérum permettent des cultures à prédominance épithéliale, alors que des taux plus faibles entraîneraient le rapide développement des fibroblastes aux dépens des cellules épithéliales. Le milieu de culture des cellules de souche, KB ou HeLa, contient à l'origine 15 % de sérum de veau, puis 10 % lors du changement de milieu (3 à 5 jours après).

e - Flacons et tubes de culture : les suspensions cellulaires sont distribuées en fonction de l'utilisation ultérieure soit en flacons de différentes capacités, soit en tubes. Nous avons utilisé :

Tableau II - Composition des solutions de Hanks, de Earle et du PBS.

	Hanks	Earle	PBS
Na Cl	8 g	6,8 g	8 g
K Cl	0,4 g	0,4 g	0,2 g
Mg $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g	0,2 g	- g
Ca $\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,185 g	0,265 g	0,13 g
Mg $\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	0,1 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,12 g	-	2,88 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	1,156 g	-
KH_2PO_4	0,06 g	-	0,2 g
Glucose	1 g	1 g	-
NaHCO_3	0,35 g	2,2 g	-
Rouge de phénol	0,02 g	0,02 g	-
Eau bidistillée	1000 ml	1000 ml	1000 g

Tableau III - Composition du milieu à l'hydrolysate de caséine.

Hydrolysate de caséine	0 , 5	g
Glutamine	0 , 1	g
Cystéine (chlorhydrate)	0 , .01	g
Nicotinamide	0 , 001	g
Pyridoxine	0 , .001	g
Thiamine	0 , 001	g
Riboflavine	0 , 0001	g
Panthoténate de calcium	0 , 001	g
Acide para-aminobenzoïque	0 , 001	g
Choline	0 , 001	g
Biotine	0 , 001	g
Acide folique	0 , 001	g
Acide ascorbique	0 , 025	g
Solution de Earle	1000	ml

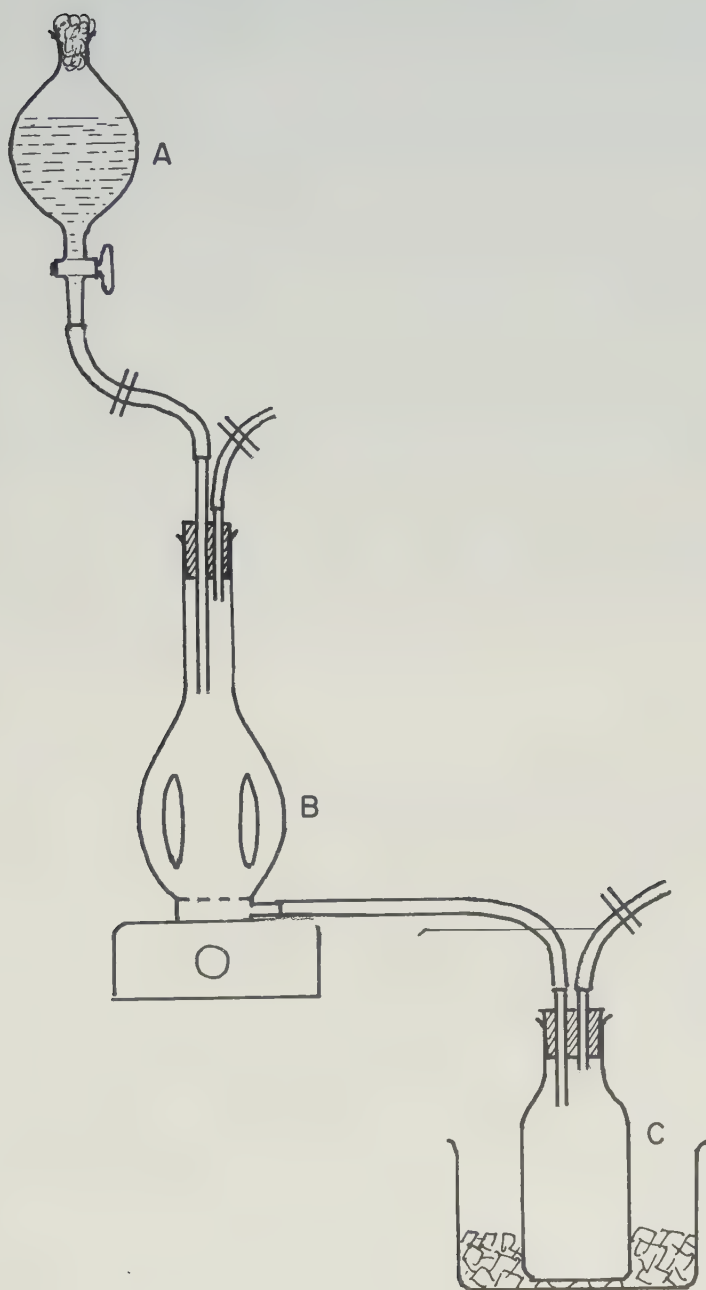


Fig. 5 - Appareil à trypsination continue

- des flacons dits de pharmacie, de capacité 250 ml en verre neutre, dans lesquels étaient introduits 25 ml de suspension cellulaire.
- des boîtes de Roux, en verre Pyrex, de 1 l avec 100 ml de suspension de cellules.
- de grandes boîtes de 3,5 l, en verre Pyrex, utilisées, au Service des Virus de l'Institut Pasteur, pour la préparation du vaccin antipoliomyélitique, avec 500 ml de suspension cellulaire.
- des tubes de culture en verre neutre (12×120 mm) de 10 ml destinés aux titrages de virus : 1 ml de culture.
- des tubes à lamelle en verre Pyrex de 20 ml, avec 2 ml de culture. Ces tubes présentent une paroi aplatie sur laquelle est déposée une lamelle. Les cellules se développent sur celle-ci, et après fixation et coloration dans le tube lui-même, cette lamelle, montée sur une lame histologique, permet l'examen microscopique des cellules normales ou lésées.

Le lavage de la verrerie destinée aux cultures de tissus est l'objet de soins particulièrement attentifs. Il consiste, au Service des Virus de l'Institut Pasteur, en un séjour dans un bain de détersif, suivi d'un rinçage abondant à l'eau du robinet, puis à l'eau bidistillée.

2 - CHOIX DES CELLULES

Nous avons travaillé sur cellules épithéliales, soit d'origine animale, cellules rénales de singe ou de lapin, soit d'origine humaine, souche HeLa, qui provient d'un cancer du col de l'utérus (53), souche KB obtenue à partir d'un épithéliome buccal humain (42).

Parmi les cellules de première explantation, nous avons utilisé le plus souvent les cellules de rein de lapin, à la fois pour leur facilité d'obtention, leur faible prix de revient et leur sensibilité relativement élevée au virus herpétique (9,83). Indiquons ici que plusieurs essais de passage du virus herpétique sur différentes cellules ne nous ont pas permis d'élever le titre de celui-ci: culture sur cellules rénales embryonnaires de lapin, sur fibroblastes pulmonaires d'embryon de lapin ou enfin sur cellules rénales de lapin adulte trypsinées à 37°.

3 - OBTENTION DES CELLULES

a - Cellules de première explantation. nous avons utilisé deux méthodes de trypsination que nous décrirons successivement. Mais que la trypsination soit continue (125, 170), ou qu'elle ait lieu à froid (37), les reins, prélevés aseptiquement sur l'animal saigné à blanc, sont décapsulés et débarrassés

aussi complètement que possible des éléments fibreux. Le tissu cortical est alors découpé en fins fragments de quelques millimètres de côté et lavé trois fois dans la solution de Hanks. Il est enfin soumis à une prétrypsination 30 mn à la température du laboratoire sur agitateur magnétique.

Le choix de la méthode de trypsination est fonction en particulier du rendement exigé dans l'expérience; c'est ainsi que la méthode à froid, qui présente plusieurs avantages pratiques (absence d'appareillage particulier, gain de temps), mais dont le rendement est certainement inférieur à celui de la trypsination continue, ne convient guère à la digestion des tissus du singe, à partir desquels on souhaite évidemment obtenir le maximum de cellules.

Trypsination continue

L'appareil schématisé fig. 5 comporte une ampoule à décantation A destinée à recevoir la trypsine, préalablement portée à 37°, dont on règle, à l'aide d'une pince à vis, l'écoulement goutte à goutte dans une fiole de Kjeldahl B. Celle-ci est posée sur agitateur magnétique, et contient un barreau aimanté. Ses parois sont creusées de quatre profonds sillons, elle est pourvue d'un double fond prolongé par une tubulure et un tuyau de caoutchouc conduisant au pot à centrifuger C, placé dans de la glace fondante. Un filtre en nylon et une seconde pince à vis sont placés sur le tuyau d'écoulement. Le premier fond percé de quatre trous fins laisse passer la suspension cellulaire, tandis que les fragments encore imparfaitement digérés restent au contact de la trypsine.

Une fois la trypsination achevée (au bout de 2 à 3 h pour une paire de reins de lapin), le contenu du flacon C est centrifugé à 1500 t pendant 10 mn. Le surnageant (débris cellulaires en suspension dans la trypsine) est écarté et remplacé par un volume égal de solution de Hanks. Après une nouvelle centrifugation, les cellules ainsi lavées sont prêtes, après addition d'un volume donné de milieu, pour la numération.

Trypsination à froid

Le matériel prétrypsiné est additionné à nouveau d'un volume de trypsine (égal à environ le triple du poids du tissu). La fiole Fourneau, qui contient le barreau aimanté, trypsine et organe à digérer, est alors placée sur un agitateur magnétique (vitesse de rotation moyenne), et le tout est laissé 16 à 18 h dans un réfrigérateur à + 4°. La suspension cellulaire obtenue est alors filtrée sur gaze directement dans le pot à centrifuger. L'élimination de la trypsine par centrifugation à faible vitesse est suivie d'un lavage dans la solution de Hanks, et on procède à la numération des cellules.

b - Cellules de souche: ces cellules sont entretenues en lignée continue, et on traite de la même manière cellules HeLa ou KB. A une boîte de Roux présentant un tapis cellulaire parfait, on ajoute 10 ml de solution de trypsine à 0,25 %. Après action 15 à 20 mn à la température du laboratoire, la couche cellulaire se détache par nappes, et il suffit de verser le contenu de la bouteille dans un pot à centrifuger, où l'on procèdera à une dispersion des cellules par aspiration - refoulement à l'aide d'une aiguille longue montée sur une seringue de 20 ml, avant de centrifuger 10 mn à 1500 t/mn. Le culot cellulaire est additionné de milieu, la suspension cellulaire est prête pour la numération.

4 - MISE EN CULTURE

a - Numération des cellules: avant la mise en culture, on apprécie la concentration cellulaire des suspensions obtenues dans l'un ou l'autre cas par numération dans un hématimètre habituel (cellule de Thoma ou cellule de Nageotte) des cellules viables: nous avons adopté la technique décrite par Philipps et Terryberry (118), qui permet, grâce à une solution dans l'eau bidistillée d'érythrosine B (concentration finale 0,02 % dans la suspension cellulaire), d'apprécier le pourcentage de cellules mortes (qui prennent le colorant et apparaissent donc rouges) et de cellules viables (non colorées). La dilution d'ensemencement est calculée en fonction de ces résultats.

b - Conditions d'ensemencement :

- les cellules de rein de lapin sont ensemencées à raison de 300.000 cellules par ml, celles de rein de singe à raison de 200.000 cellules par ml. Dans ces conditions, le tapis cellulaire est continu au bout de 7 à 10 jours (changement de milieu au 5^e ou 7^e jour).

- les cellules KB ou HeLa, qui prolifèrent beaucoup plus rapidement, sont, elles, ensemencées à la concentration de 100.000 cellules par ml. Le tapis cellulaire est continu entre le 5^e et le 7^e jour (milieu changé le 3^e ou le 5^e jour).

5 - SOURCE DE VIRUS

Le virus destiné à l'infection des cellules en culture est préparé sur cellules, soit qu'il ait été isolé à l'origine sur celles-ci (souche "59-3055"), soit qu'il leur ait été adapté par passages successifs d'une "souche-oeufs" par exemple (souche "54-33").

a - Stock de virus: c'est, comme dans le cas des inoculations sur membranes chorio-allantoïques, le matériel infectieux préparé régulièrement à partir de passages déterminés, de la manière suivante: les cellules sont

ensemencées avec le liquide de culture, en général non dilué, provenant d'un passage précédent sous un volume égal au 1/10 de celui du milieu.

Après un temps variable, fonction de l'évolution de la dégénérescence du tapis cellulaire (24 à 48 h dans les conditions adoptées), on recueille la suspension cellulaire, après congélation - décongélation directement dans la boîte de culture, et le virus qu'elle renferme est ensuite conservé soit :

- à + 4°, si le temps de conservation ne doit pas excéder quelques semaines (pour la durée d'une expérience par exemple), soit en présence du culot cellulaire (et, dans ce cas, la centrifugation se situe juste avant l'inoculation), soit, après élimination des débris cellulaires, sous forme de mélange à parties égales avec du lait écrémé.

- à - 70° (conservateur à neige carbonique), après dilution dans le lait, pour une conservation de plusieurs mois.

Ces précautions quant au mode de conservation s'imposent en effet, étant donné la fragilité du virus herpétique et la faible concentration protéique, au regard de celle d'émulsions de tissus animaux, des liquides surnageants de culture de tissus (95).

Sauf indication particulière, le virus, servant à l'inoculation d'une catégorie donnée de cellules, est préparé sur ces mêmes cellules. Le titre est déterminé sur tubes, la lecture faite au 3° et 5° jour, et l'on met en compte dans le calcul de la DI_{50} tous les tubes qui présentent une dégénérescence spécifique, qu'elle soit totale ou non.

Nous avons préparé six de ces stocks de virus pour la souche "54-33", au 16°, 21°, 28°, 29° et 30° passage, de titres respectifs 6,3 - 6 - 7,1 - 6,3 et 6,1 log DI_{50} /ml, et quatre pour la souche "59-3055", au 2°, 3°, 5° et 6° passage, de titres correspondants 6,4 - 6,1 - 5,5 et 6,2 log DI_{50} /ml.

b - Mode d'inoculation: au moment de l'inoculation le milieu de culture est remplacé par un milieu sans sérum. En effet, celui-ci contient parfois des inhibiteurs non spécifiques qui pourraient gêner la croissance du virus. D'autre part, c'est une source supplémentaire de protéines étrangères, dont la présence rend plus complexes encore les problèmes de purification ou de fractionnement. Enfin, les liquides surnageants de cultures de cellules cultivées en présence de sérum sont régulièrement anticomplémentaires.

Pourtant, pour les cellules de souche, que l'on peut difficilement conserver en l'absence totale de sérum sans voir apparaître de dégénérescence aspécifique, on doit maintenir dans le milieu, même après inoculation, la concentration minimale de 2,5 % de sérum.

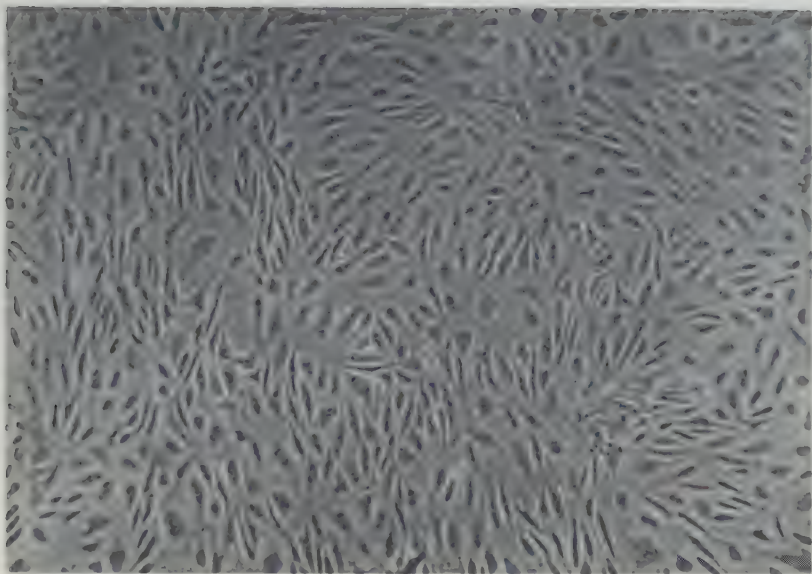


Fig. 6a - Cellules de rein de lapin normales.
Etat frais (microscope à contraste de phase). Gr. 85.

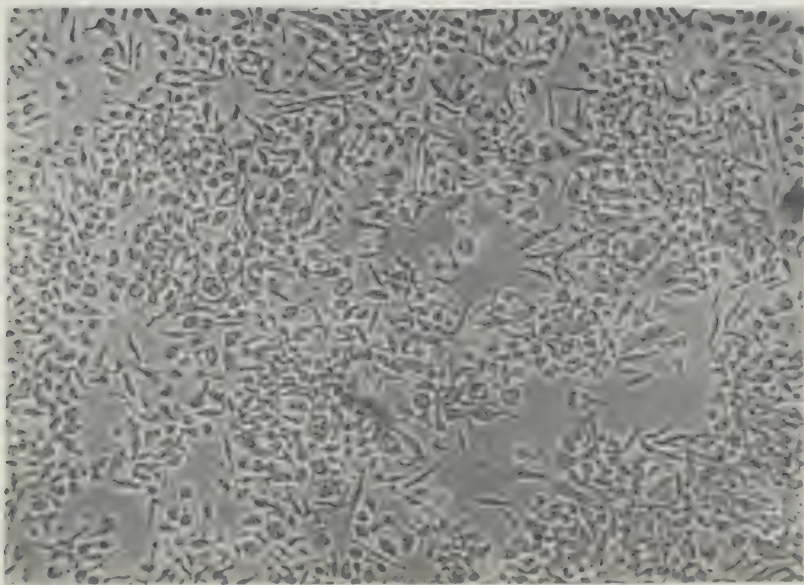


Fig. 6b - Cellules de rein de lapin infectées par le virus herpétique.
Etat frais (microscope à contraste de phase). Gr. 85.

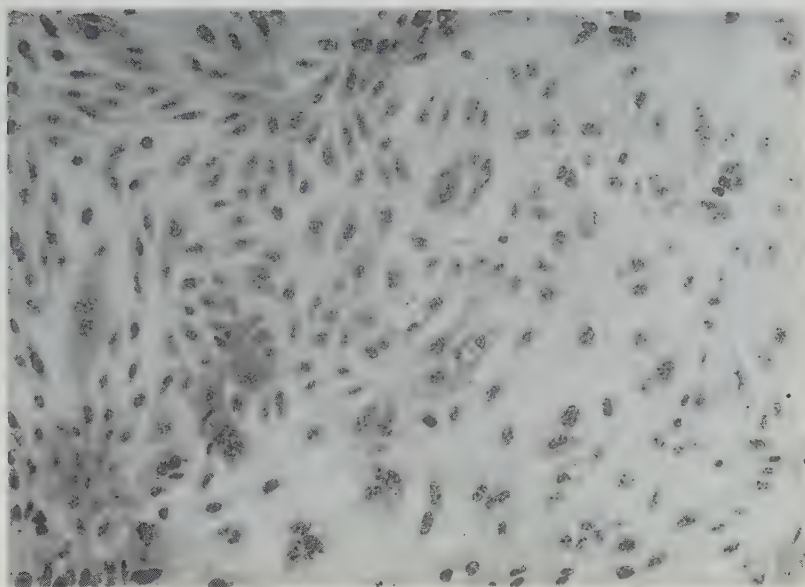


Fig. 7a - Cellules de rein de lapin normales.
Hémalun-éosine. Gr. 135.

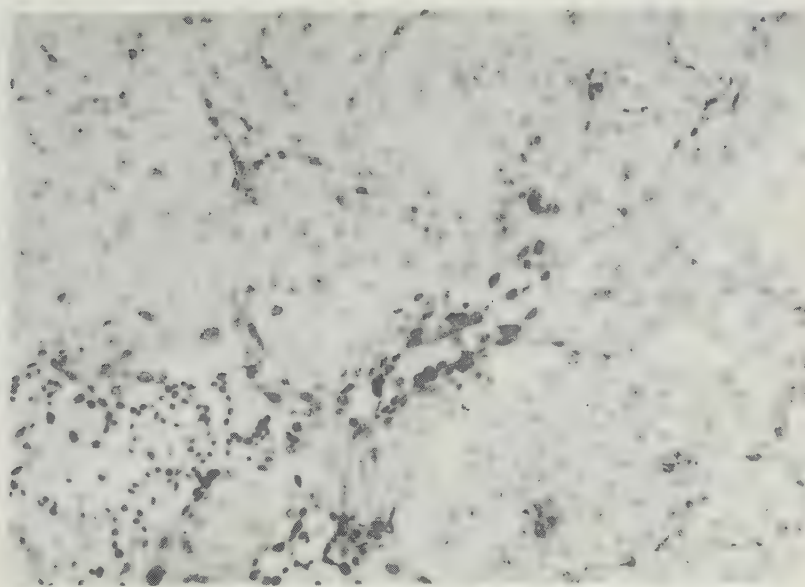


Fig. 7b - Cellules de rein de lapin infectées par le virus herpétique: premiers stades de l'infection.
Hémalun-éosine. Gr. 135.

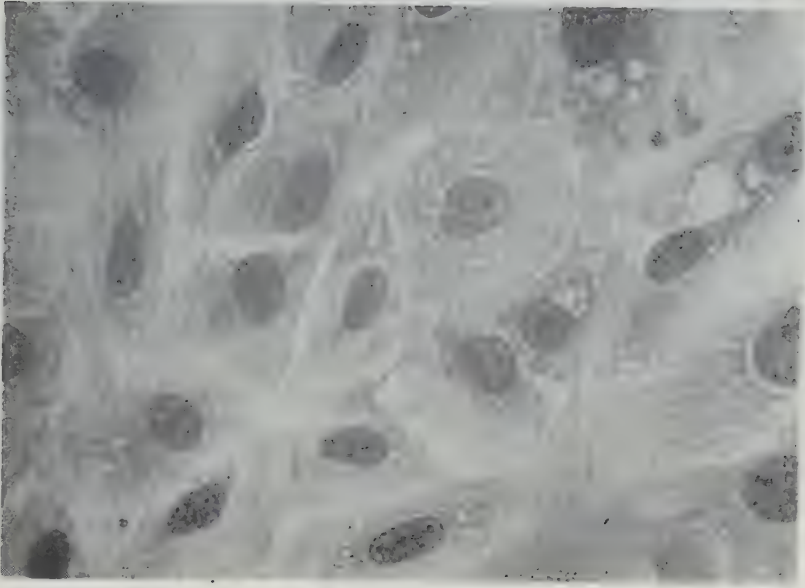


Fig. 8a - Cellules de rein de lapin normales.
Hémalun-éosine. Gr. 610.

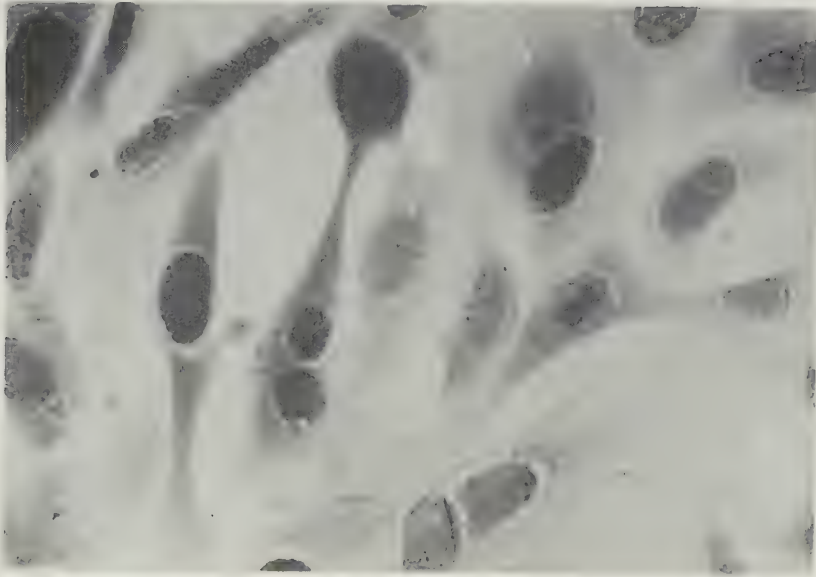


Fig. 8b - Cellules de rein de lapin infectées par le virus herpétique: noyaux atteints, disparition du nucléole; vers le centre, une inclusion.
Hémalun-éosine. Gr. 610.

6 - ASPECT DES LESIONS

La figure 6a donne l'aspect de cellules de rein de lapin normales, cellules assez allongées, et la figure 6 b celui de ces mêmes cellules après infection par le virus herpétique. On notera l'aspect en grappes, particulièrement visible sur les préparations fixées, le long de trames probablement fibroblastiques, des cellules atteintes qui perdent progressivement leur aspect ellipsoïdal, pour s'arrondir uniformément, aussi la présence de noyaux de taille très accrue. Les fig. 7 et 8 a et b correspondent respectivement aux cellules normales et infectées après fixation au liquide de Bouin et coloration à l'hémalum-éosine: présence, dans les noyaux des cellules lésées, des altérations nucléaires caractéristiques de l'infection herpétique.

Les figures 9 et 10 a et b correspondent respectivement à l'aspect des cellules KB normales et infectées après fixation et coloration, cellules régulièrement arrondies, qui, après infection, deviennent plus réfringentes et apparaissent progressivement sous forme d'amas isolés; on reconnaît, d'une part l'aspect habituel des cellules de souche, avec quelques noyaux atypiques, d'autre part une inclusion nucléaire herpétique.

7 - PREPARATION DES ANTIGENES

Il était normal d'espérer utiliser directement les liquides surnageants de cultures de tissus comme antigènes pour fixation du complément. C'était même sur cet espoir qu'était fondée l'application de cette technique: même s'il était nécessaire de mettre en jeu des procédés de concentration ultérieurs, les volumes produits étaient considérables au regard de ceux obtenus *in vivo*; en outre, la teneur en impuretés était nettement plus faible que celle de broyats d'organes. C'était donc la méthode de choix, dont on regrettait que l'utilisation en eût été aussi longtemps différée.

Ces perspectives furent rapidement déçues, d'une part en raison du pouvoir anticomplémentaire fréquent de tels liquides, d'autre part et surtout en raison de la médiocrité, ou même de l'absence, de leur pouvoir antigénique. On trouvera dans le tableau IV un exemple du titre de ces liquides. Les essais de concentration (par ultrafiltration ou pervaporation ou après lyophilisation) s'étant révélés difficiles ou même impossibles (apparition de fort pouvoir anticomplémentaire, masquant toute concentration éventuelle du produit actif), nous avons été appelée à extraire le contenu antigénique des cellules elles-mêmes, avant qu'elles ne l'aient libéré dans le milieu. Cette méthode nous a été suggérée par Monsieur le Professeur S. Gard, chef du "Virusinstitutionen", Karolinska Institutet, Stockholm, que nous remercions d'avoir bien voulu nous communiquer certaines de ses courbes, obtenues à l'occasion d'études sur le virus poliomvélitique, et faisant ressortir la proportion d'antigène immunisant retenu à l'intérieur des cellules (51). Elle a l'avantage de permettre dans le même temps la concentration du matériel actif (6).

a - Récupération des cellules: au stade que nous avons choisi pour le prélèvement, la lyse cellulaire est à peine amorcée, et la presque totalité des cellules, à l'exception de quelques-unes superficielles, adhèrent encore au verre, tout au moins dans le cas des cellules de rein de lapin ou de rein de singe; en effet, les cellules KB lésées se détachent, par contre, en nappes avant même le stade de la lyse finale, et une simple agitation du flacon de culture suffit à les décoller.

Nous avons tout d'abord essayé de faire éclater les cellules dans le liquide même qui permettrait de les décoller: on introduit, après recueil du milieu de culture (conservé pour contrôle par fixation du complément), un volume d'eau distillée juste suffisant pour recouvrir le tapis cellulaire (10 ml pour une boîte de Roux), et le flacon de culture est directement congelé à -30° ; son contenu, après décongélation, est centrifugé, et le surnageant de cette centrifugation, après addition, pour rétablir l'isotonicité, d'une solution concentrée de tampon au véronal, essayé par fixation du complément: l'antigène est souvent anticomplémentaire, et de titre toujours inférieur à celui obtenu par la technique de versénation. En outre le volume minimum d'eau distillée exigé pour recouvrir le tapis cellulaire ne permet pas un taux de concentration supérieur à 10.

Aussi avons-nous alors utilisé l'agent chélatant, connu sous le nom de versène. Par lavage du tapis cellulaire deux fois avec du PBS sans calcium ni magnésium, on débarrasse la culture des ions métalliques qui rendraient le versène inefficace, puis on ajoute un volume de solution de versène préalablement portée à 37° , suffisant pour recouvrir la nappe cellulaire. Après action 15 à 30 mn à 37° et agitation, les cellules se détachent facilement; le versène est éliminé par centrifugation, et le culot cellulaire repris dans un volume de tampon au véronal correspondant à la concentration que l'on veut effectuer; un rapport de 50 entre le volume initial de suspension cellulaire et celui du tampon au véronal a été finalement adopté.

b - Extraction du contenu cellulaire :

homogénéisation: la suspension cellulaire dans le tampon au véronal est soumise à deux homogénéisations successives de chacune 30 sec. dans un homogénéiseur tournant à grande vitesse (40.000 t/sec.); le résultat est centrifugé, et le surnageant essayé par fixation du complément. Le risque de dénaturation de l'antigène par échauffement dû au fonctionnement de l'appareil n'étant pas négligeable en dépit d'un manchon de glace, et les titres ne s'étant pas révélés nettement supérieurs à ceux obtenus par congélations-décongélation, nous avons abandonné l'homogénéisation au profit de cette méthode.

- congélations-décongélation: la suspension cellulaire dans le tampon au véronal est soumise à des congélations-décongélation successives par

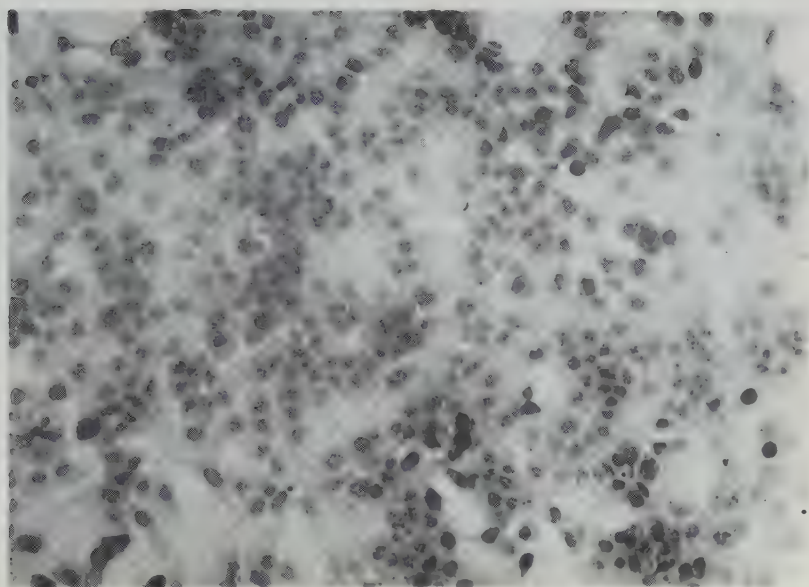


Fig. 9a - Cellules KB normales.
Hémalun-éosine. Gr. 135.

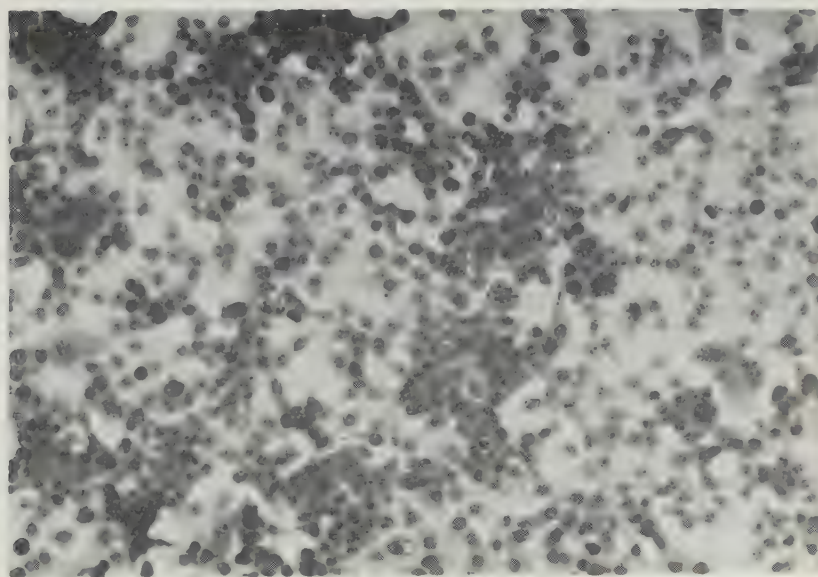


Fig. 9b - Cellules KB infectées par le virus herpétique; foyers dispersés, groupant des cellules atteintes, plus réfringentes. On peut, déjà à ce grossissement, distinguer quelques inclusions intranucléaires.
Hémalun-éosine. Gr. 135.

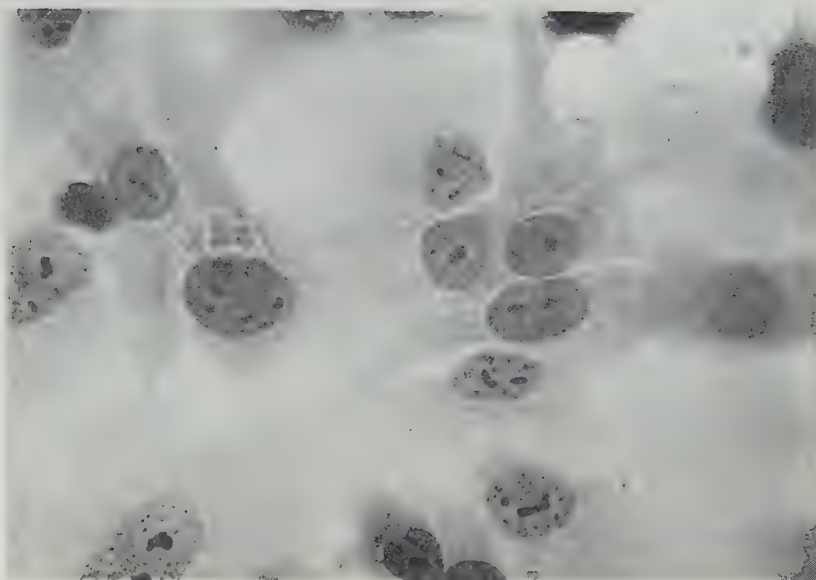


Fig. 10a - Cellules KB normales.
Hémalun-éosine. Gr. 610.

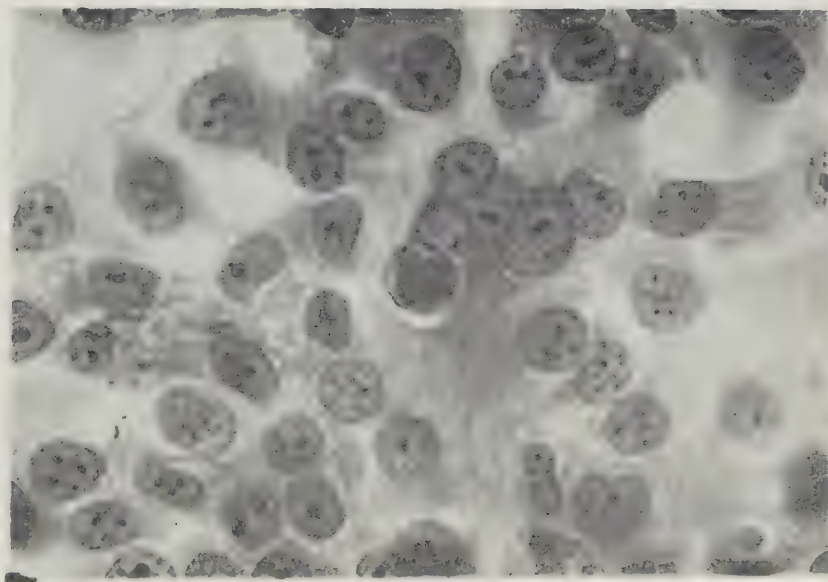


Fig. 10b - Cellules KB infectées par le virus herpétique. Au centre, une inclusion.
Hémalun-éosine. Gr. 610.

Tableau IV - Antigènes herpétiques d'origine cellulaire.

Antigènes			Dilutions des sérums					Témoins antigènes
			8	16	32	64	128	
Antigène "cellules rein de lapin"			Sérum de lapin immunisé.					
	S	1	4	4	5	0	0	0
	C	2	4	4	4	4	4	0
		4	4	4	4	4	4	0
		8	4	4	4	4	1	0
		16	4	4	4	5	1	0
		32	4	4	3	1	0	0
RLN		1	0	0	0	0	0	0
Antigène "cellules rein de singe"								
	S	1	4	3	0	0	0	0
	C	2	4	4	4	4	4	0
		4	4	4	4	4	4	0
		8	4	4	4	3	0	0
		16	3	2	1	0	0	0
RSN		1	0	0	0	0	0	0
Antigène "cellules HeLa"								
	S	1	4	4	4	4	1	0
	C	2	4	4	4	4	4	0
		4	4	4	4	4	4	0
		8	4	4	4	4	4	0
		16	4	4	4	4	4	0
		32	4	4	4	2	1	0
HeLa N		1	0	0	0	0	0	0
Diluant		1	0	0	0	-	-	-
Antigène "cellules KB"			Sérum humain					
	S	1	0	0	0	0	0	0
	C	2	4	4	4	3	0	0
		4	4	4	4	1	0	0
		8	2	4	4	tr.	0	0
		16	tr.	4	4	0	0	0
		32	0	1	2	1	0	0
KB N		1	0	0	0	0	0	0
Diluant			0	0	0	-	-	-

Antigènes «cellules de rein de lapin», «cellules de rein de singe»,
«cellules HeLa» et «cellules KB» préparés sur ces cellules :

S - surmeagants de culture

C - contenu du culot cellulaire, après extraction et concentration 50 fois.

RLN, RSN, HeLa N, KB N, antigènes témoins préparés à partir de cellules de
rein de lapin, rein de singe, HeLa et KB normales. (même taux de concentration)

L'antigène provenant de cellules KB est titré sur sérum humain, de manière à
éviter les réactions aspécifiques, cf. «Spécificité des résultats».



Fig. 11a - Cellules KB normales.
Etat frais (microscope à contraste de phase). Gr. 85.

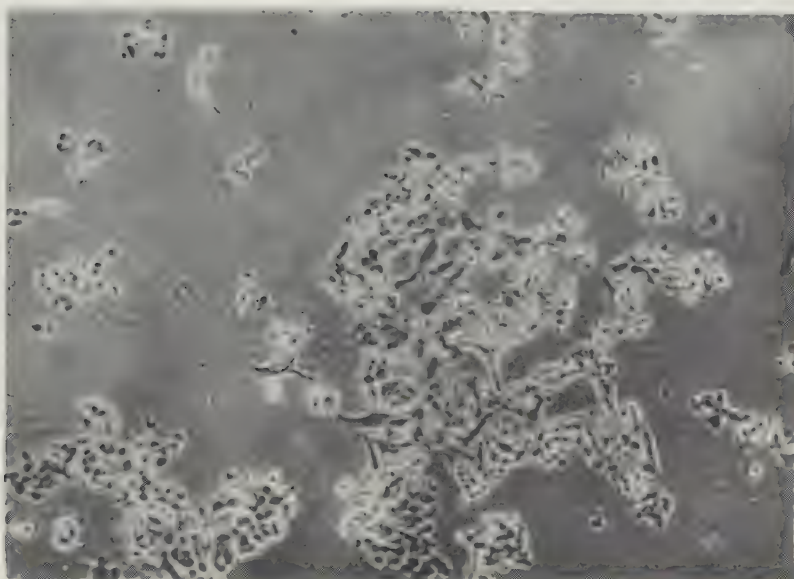


Fig. 11b - Cellules KB infectées par le virus poliomyélitique.
Etat frais (microscope à contraste de phase). Gr. 85.

passage de -40° à $+37^{\circ}$. Il est nécessaire de répéter six fois l'opération pour recueillir la plus grande partie du contenu antigénique des cellules, encore que le résidu cellulaire, extrait une seconde fois, puisse libérer une faible quantité de matériel actif. L'antigène est le surnageant d'une dernière centrifugation à 2500 t 10 mn. Il est dépourvu de pouvoir anticomplémentaire et son titre moyen est indiqué dans le tableau IV.

III - ANTIGENE POLIOMYELITIQUE

Pour essayer de conserver à ce chapitre le maximum de clarté, nous avons préféré traiter en des paragraphes distincts les techniques appliquées à l'étude des antigènes herpétiques et poliomyélitiques. En effet, les difficultés rencontrées dans l'un et l'autre cas ne sont pas toujours les mêmes et les solutions apportées aux problèmes correspondants peuvent, de ce fait, diverger, rendant fastidieux le renvoi alternatif à l'un ou l'autre de ces virus.

Nous exposerons donc maintenant les méthodes que nous avons utilisées pour la préparation des antigènes poliomyélitiques, nous permettant pourtant de renvoyer à la rubrique correspondante du paragraphe consacré au virus herpétique, si description en a déjà été donnée.

En dépit de plusieurs travaux sur le sujet (26, 27, 87, 120, 121, 147), l'utilisation comme source d'antigènes de moelles de singes ou même de cerveaux de rongeurs, après l'adaptation à ces animaux des virus poliomyélitiques du type II, limitait beaucoup l'expérimentation. Celle-ci se trouva, par contre, considérablement facilitée, quand les travaux de Enders (43) eurent rendu possible la culture *in vitro* du virus sur cellules.

Nous nous bornerons à donner à titre comparatif, dans le tableau V, un exemple d'antigène préparé, par la méthode de Casals (25), à partir de cerveaux de souris infectés avec la souche MEF 1 de virus poliomyélitique; et nous décrirons maintenant les procédés d'obtention du matériel antigénique à partir de culture cellulaires.

Culture du virus dans les cellules *in vitro*

1 - CELLULES

Les travaux de Schmidt *et al.* (138, 139) ayant montré la supériorité des cellules de souche sur celles de rein de singe dans la préparation des antigènes poliomyélitiques pour fixation du complément, nous avons choisi les cellules de la souche KB.

Les cellules infectées par les virus poliomyélitiques de type I, II et III présentent la même dégénérescence qui se traduit par un arrondissement

progressif, accompagné d'une réfringence accrue, puis rapidement par un détachement dans son ensemble du tapis cellulaire (fig. 11 a et b).

Les conditions d'inoculation sont les mêmes que dans le cas du virus herpétique: introduction du virus, après remplacement du milieu de culture par un milieu ne contenant que 2,5 % de sérum de veau.

2 - VIRUS

Nous avons adopté les souches classiques de virus poliomyélitique:

- type I, Mahoney
- type II, MEF 1
- type III, Saukett

Les virus, destinés à l'inoculation, sont préparés sur cellules KB, après passages sur ces cellules de virus cultivés sur reins de singe. Leur titre, déterminé par inoculation sur tubes de cellules KB, est exprimé par le nombre de DI_{50} contenu dans 1 ml. Les suspensions virulentes que nous avons utilisées contenaient, en général entre 6 et 8 log DI_{50} .

3 - PREPARATION DES ANTIGENES

Les surnageants de cultures de tissus se sont révélés entre nos mains de titre trop faible ou doués de pouvoir anticomplémentaire trop important pour être utilisés sans inconvénients. D'autre part, les méthodes de concentration proposées par différents auteurs, telles que l'ultrafiltration préconisée par Svedmyr *et al.* (157), ou l'ultracentrifugation (10, 14), sont souvent longues et onéreuses. Aussi nous a-t-il semblé plus avantageux d'essayer de concentrer à l'origine le matériel antigénique. La méthode adoptée (7) consiste, comme dans le cas de l'herpès, à extraire le matériel antigénique des cellules par des congélations-décongélations successives, et ne diffère de celle décrite à cette occasion que par l'absence du traitement préalable au versène, les cellules KB lésées se détachant spontanément du verre, comme nous l'avons déjà indiqué.

Le tableau V donne le titre d'antigènes correspondant à chacun des trois types.

IV CONSERVATION DES ANTIGENES

Nos antigènes herpétique (provenant d'oeufs ou de cultures de tissus) ou poliomyélitique sont conservés à + 4° après addition de merthiolate (concentration finale 10^{-4}), sauf s'ils doivent subir des traitements

Tableau V - Antigènes poliomyélitiques.

Antigènes		Dilutions des sérums					Témoins antigènes
		8	16	32	64	128	
Antigène "cerveaux de souriceaux"							
	1	4	4	2	0	0	0
	2	4	2	0	0	0	0
Normal	1	0	0	0	0	0	0
Antigènes "cultures cellulaires"							
Type I	S 1	3	2	0	0	0	0
	C 2	4	4	4	4	3	0
	4	4	4	4	4	1	0
	8	4	4	4	tr.	0	0
	16	3	2	tr.	0	0	0
Type II	S 1	4	4	4	4	2	0
	C 2	4	4	4	4	3	0
	4	4	4	4	4	2	0
	8	4	4	4	4	1	0
	16	4	4	4	4	tr.	0
	32	4	4	4	3	0	0
Type III	S 1	2	0	0	0	0	0
	C 2	4	4	4	4	3	0
	4	4	4	4	4	2	0
	8	3	4	4	1	0	0
	16	2	2	2	0	0	0
K B N	1	0	0	0	0	0	0
Diluant		0	0	0			

Sérums utilisés : sérums humains positifs, spécifiques de type.

Antigène « cerveaux de souriceaux » : préparé par la méthode de Casals.

Antigènes « cultures cellulaires » : préparés sur cellules K B.

S - surageant de culture

C - contenu du culot cellulaire, après extraction et concentration 50 fois.

K B N, antigène témoin préparé à partir de cellules K B normales (même taux de concentration).

chimiques ultérieurs, la présence de merthiolate risquant de gêner ou de fausser l'interprétation de certaines réactions, étant donné, en particulier, sa forte absorption dans l'ultraviolet.

Aucun procédé d'inactivation du pouvoir infectieux éventuel de ces antigènes n'est utilisé. Dans le cas de l'herpès, celui-ci baisse très rapidement au cours de la conservation, en raison même de la fragilité du virus; aussi les titrages d'infectiosité des différentes fractions, qui ont servi à l'établissement des courbes du chapitre III, sont-ils rarement pratiqués plus de 3 j après le prélèvement. Quant aux antigènes poliomyélitiques, le chauffage modifiant leur spécificité (137), nous les avons employés virulents, avec les précautions de rigueur dans un laboratoire de virologie.

V - TECHNIQUES SEROLOGIQUES

A - MICROREACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT

Etant donné les faibles volumes de matériel actif disponibles, nous avons tout d'abord été contrainte de substituer aux méthodes classiques en tubes une technique de réaction de fixation du complément sur plaques de matière plastique (97). Le volume total de chaque goutte, qui correspond alors à un tube à hémolyse, peut être ainsi réduit à 0,1 ml (5 gouttes de 0,02 ml, mesurées à l'aide de pipettes Pasteur calibrées), et la lecture se fait sur négatoscope, par appréciation du degré d'hémolyse des hématies, rassemblées en un disque central. La méthode exige un certain nombre de précautions, concernant en particulier le pouvoir anticomplémentaire des différents éléments en réaction, et le titrage préalable sur plaque du complément et du sérum hémolytique.

Par la suite, lorsque nous avons pu, grâce aux cultures de tissu, disposer de plus grandes quantités d'antigènes, nous avons adopté pour des raisons pratiques la technique actuelle du laboratoire de sérologie du Service des Virus de l'Institut Pasteur, qui utilise de petits tubes à hémolyse de 9 x 90 mm. C'est cette technique que nous décrirons ici en détail.

B - REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT EN TUBES

1 - DILUANT

C'est le tampon au véronal, additionné de calcium et de magnésium, préconisé par Mayer *et al.* (105), dont la composition est la suivante:

Na Cl	85 g
Acide 5-5-diéthylbarbiturique	5,75 g
5-5-diéthylbarbiturate de sodium	3,75 g

Ca Cl ₂	0,28 g
Mg Cl ₂ , 6 H ₂ O	1,68 g
Eau bidistillée	2000 ml

Son p^H est de 7,2 et il est dilué au 1/5 dans de l'eau bidistillée, au moment de l'emploi.

Tous les éléments de la réaction sont dilués dans ce tampon, et il sert aussi, comme nous l'avons indiqué, à la préparation des antigènes.

2 - COMPLÉMENT

C'est du sérum de cobaye conservé congelé à - 70°. Le délai de conservation n'excède pas un mois, au cours duquel il se maintient stable (titrage à l'origine et en cours de conservation).

Ce complément est titré de la manière suivante: après dilution préalable (en général au 1/80), on détermine l'unité de complément grâce à une échelle de dilutions de progression arithmétique 0,02, allant de 0,02 à 0,30 ml.

Le volume est ajusté à 0,4 ml avec le tampon au véronal, et après incubation 1 h à 37°, on ajoute les hématies sensibilisées. La lecture a lieu après une nouvelle incubation 30 mn à 37°, et l'unité de complément est définie comme la plus petite quantité de complément qui provoque l'hémolyse totale.

La dilution de complément, utilisée dans la réaction elle-même est choisie telle que l'on introduise 2 unités dans un volume de 0,2 ml.

3 - HEMATIES

Ce sont des hématies de mouton prélevées chaque mois et conservées à + 4° dans le liquide d'Alsever; elles sont lavées trois fois, avant usage, dans le tampon au véronal, et diluées à 2 % dans celui-ci, après centrifugation en tube gradué dans des conditions toujours identiques.

Elles sont sensibilisées par mélange à volumes égaux avec le sérum hémolytique.

4 - SERUM HEMOLYTIQUE

Il s'agit du sérum hémolytique de Serpasteur préparé sur lapin, et dilué de manière à contenir dans 0,1 ml 3 unités

5. CONDUITE DE LA REACTION

Les différents éléments sont introduits sous les volumes suivants et dans l'ordre indiqué :

sérum	0,1 ml
antigène	0,1 ml
complément	0,2 ml
hématies sensibilisées	0,2 ml

Le complexe antigène-sérum-complément est préalablement incubé 13 h à + 4°, après quoi l'on ajoute les hématies sensibilisées. Après séjour à 37°, 15 à 30 mn, la lecture se fait immédiatement et, nous avons adopté, pour l'expression des différents degrés d'hémolyse, la notation suivante :

- 0 hémolyse totale
- 4 absence totale d'hémolyse
- 1 - 2 - 3 degrés intermédiaires.
- tr. traces d'hématies.

A chaque groupe de réactions sont adjoints les témoins suivants:

contrôle du titre du complément: dans quatre tubes, on introduit les volumes suivants de complément dilué (2 unités): 0,05 - 0,1 - 0,15 et 0,2 ml, correspondant respectivement à 0,5 - 1 - 1,5 et 2 unités de complément; le volume est ajusté à 0,4 ml avec le tampon. Il est ainsi possible, en suivant l'hémolyse de ces témoins au cours de l'incubation à 37°, de s'assurer du titre exact du complément introduit dans la réaction, aussi bien que de constater une baisse anormale éventuelle survenue, par exemple, au cours de la distribution ou de la première incubation au froid, qui fausserait l'interprétation des résultats.

témoins sérum: ils permettent de vérifier l'absence de pouvoir anticomplémentaire du sérum utilisé, et correspondent aux différentes (ou aux premières) dilutions du sérum additionnées de complément, en l'absence d'antigène (remplacé par 0,1 ml de tampon); s'il y a fixation, elle est aspécifique, et le sérum est anticomplémentaire jusqu'à la dilution où l'hémolyse est totale (C'est, en général, le dernier rang du titrage d'un antigène, noté "diluant", voir tableaux I, IV et V).

témoins antigène: ils permettent, de même, de contrôler l'absence de pouvoir anticomplémentaire de l'antigène; les différentes dilutions d'antigène reçoivent, en l'absence de sérum (remplacé par 0,1 ml de tampon), du complément. L'hémolyse doit être totale; sinon, l'antigène est dit anticomplémentaire. (C'est, en général, la dernière colonne à droite des titrages d'antigènes, voir tableaux I, IV et V)

6 TITRAGE DES ANTIGENES

Nous avons adopté, pour l'appréciation du titre de nos antigènes, la méthode de titrage bidimensionnelle, comportant l'introduction de dilutions progressivement croissantes (progression géométrique de raison 2) des deux éléments, sérum et antigène.

Dans ces conditions, l'unité antigénique est définie comme la plus grande dilution d'antigène qui donne encore une fixation complète (absence totale d'hémolyse) en présence de la plus grande dilution de sérum.

Antigène témoin: c'est l'"antigène" obtenu à partir du matériel normal non infecté, sur lequel nous reviendrons au paragraphe consacré à la spécificité des résultats. Il accompagne chaque titrage. (C'est l'avant-dernier rang du titrage d'un antigène, voir tableaux I, IV et V).

C - SERUMS IMMUNS

1 - SERUMS HERPETIQUES

Quelques essais préliminaires de préparation de sérum immun sur poules ne nous ont pas permis d'obtenir d'anticorps fixant le complément décelables par la méthode directe. D'autre part, l'immunisation d'un singe avec des cerveaux de souris infectés nous ayant fourni un sérum qui réagissait avec les antigènes témoins de membranes chorio-allantoïques (présence d'anticorps anti-antigène Forssman, dont l'essai d'élimination, par absorption avec une émulsion de reins de cobaye, a rendu le sérum anti-complémentaire et inutilisable), nous nous sommes bornée, par la suite, à préparer nos sérums sur lapins.

a - Sérums de lapins: on choisit des lapins, dont le sérum s'avère, dans un essai préalable, dépourvu de pouvoir anticomplémentaire.

Nos premiers antigènes provenant de membranes chorio-allantoïques, nous avons choisi le cerveau de lapin infecté comme substrat du virus pour l'immunisation: nous n'avions dans ces conditions, pas de réaction aspécifique entre les sérums ainsi obtenus et le matériel membranes chorio-allantoïques normales.

Les lapins (deux au moins par expérience) reçoivent cinq injections intrapéritonéales d'1 ml d'une émulsion de cerveau de lapin à 10^{-1} , à raison de deux par semaine. Ils sont saignés entre la 5^e et la 8^e semaine après le début de l'immunisation.

L'adjonction à l'émulsion d'immunisation d'adjuvants, tels que le mélange "Bayol-Arlacel" (133), ne nous ayant pas fourni de sérums de

Titre d'anticorps FC

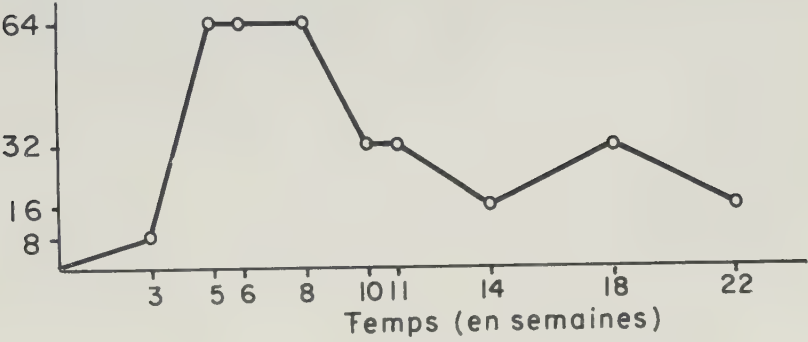


Fig. 12 - Evolution des anticorps herpétiques fixant le complément (FC). Lapin 635.
Titre exprimé par l'inverse de la dilution limite.

titre supérieur à celui des sérums témoins, nous avons, par la suite, abandonné cette technique.

Dans les conditions d'immunisation décrites, il arrive que les lapins présentent une infection herpétique: ou ils y succombent avant que leur sérum ne contienne de quantités appréciables d'anticorps fixant le complément, ou ils s'en rétablissent, et les meilleurs sérums que nous ayons obtenus proviennent de tels lapins ayant survécu à une infection herpétique. La fig. 12 correspond à la courbe d'immunisation d'un de ces lapins (lapin 635, immunisé avec la souche "Bruxelles"): on voit que le taux maximum d'anticorps reste stable entre la 5^e et la 8^e semaine, puis décroît; une injection de rappel à la 6^e semaine n'a pas permis de ralentir cette chute.

Les titres obtenus dépassent rarement le 1/64^o ou le 1/128^o.

D'autre part, nous avons immunisé des lapins avec du matériel virulent provenant de cultures de tissus, cellules de rein de lapin d'une part, cellules KB d'autre part. Dans l'un et l'autre cas, les cellules infectées sont congelées-décongelées une fois, et le virus conservé à + 4^o en présence des débris cellulaires. L'immunisation est conduite comme suit: les lapins reçoivent cinq injections intradermiques, à raison de deux par semaine, de 1 ml de suspension virulente (préalablement centrifugée), mêlée à 1 ml d'extrait testiculaire de lapin fraîchement préparé (technique mise au point au Service des Virus de l'Institut Pasteur par Monsieur L. Chaumont). Dix jours après la dernière injection intrapéritonéale, on procède à une injection intraveineuse du même mélange. Les lapins sont saignés 40 jours après le début de l'immunisation et les titres obtenus alors n'excèdent pas, ici non plus, le 1/64^o ou le 1/128^o.

b - Sérums humains: les sérums humains, que nous avons utilisés dans cette étude, provenaient de malades ayant présenté une infection herpétique récente. Ces sérums nous ont été pour la plupart transmis par Mr le Docteur G.L. Daguet, que nous remercions ici de sa grande obligeance. Quelques autres avaient été reçus au laboratoire des diagnostics du Service des Virus de l'Institut Pasteur.

2 - SERUMS POLIOMYELITIQUES

a - Sérums humains: ce fut notre plus grande source de sérums positifs, étant donné les difficultés rencontrées pour préparer sur animaux des sérums fixant le complément.

Les sérums humains utilisés sont des sérums de malades ayant présenté une infection poliomyélitique récente et qui nous ont été fournis par Mme le Dr Vétérinaire J. Virat, que nous remercions de nous avoir assuré une fourniture régulière.

Dans la mesure du possible, nous nous sommes efforcée de n'utiliser que des sérums positifs pour un seul type.

b. Sérums animaux

Sérums de poussins: nous n'avons pas pu trouver un seul sérum positif par fixation de complément directe parmi les quelques 20 sérums de poussins examinés qui avaient constitué des anticorps neutralisants après injection de vaccin antipoliomyélitique (contrôle d'antigénicité).

Sérums de singes: parmi plusieurs sérums essayés par fixation de complément, nous n'avons trouvé que deux sérums positifs (1/64) singes 550 pour le type I, et 521 pour le type II. Ils avaient reçu du virus vivant, présenté des symptômes de poliomyélite, et avaient des anticorps neutralisants à des titres très élevés.

Sérums de lapins: enfin, nous avons obtenu à partir de lapins immunisés avec du virus cultivé sur reins de singe et selon la technique adoptée pour le virus herpétique (quatre injections intradermiques, à une semaine d'intervalle, de 1 ml de virus poliomyélitique et de 1 ml d'extrait testiculaire, suivies d'une injection intraveineuse 30 j après le début de l'immunisation, saignée 10 j après), des sérums qui fixaient aussi le complément en présence des antigènes témoins normaux, réaction supprimée par le traitement à l'éther des antigènes, comme nous l'indiquerons plus loin.

D - SPECIFICITE DES RESULTATS

1 - SERUMS NEGATIFS

Lors de la première utilisation d'un antigène nouveau (antigène herpétique provenant de membranes chorio-allantoïques ou de cultures cellulaires, antigène poliomyélitique dérivé de cellules KB, par exemple), cet antigène est essayé sur un certain nombre de sérums dits négatifs, c'est-à-dire connus pour ne pas contenir d'anticorps correspondants.

2 - ANTIGENES TEMOINS

Nous avons déjà mentionné leur introduction dans toute réaction de fixation du complément. Rappelons que nous désignons sous cette expression le matériel obtenu, à partir des tissus ou cellules non infectés par le virus (normaux), par un traitement équivalent à celui correspondant à l'antigène spécifique. C'est ainsi qu'à chaque préparation particulière est adjoint un antigène témoin extrait dans les mêmes conditions que l'antigène herpétique ou poliomyélitique: antigène membranes chorio-allantoïques normales (McN), antigène cellules de rein de lapin normales (RLN), ou KB normales (KBN) préparés à partir de membranes ou de cellules (par versation) de même

age que celles infectées par le virus. Ces antigènes permettent donc de déceler toute réaction aspécifique éventuelle entre les sérums immuns et le matériel tissulaire normal. Dans le cas où cette réaction a lieu, l'antigène spécifique renfermant lui-même ce matériel, on risquerait de lui attribuer un titre supérieur à son titre réel, ou même de reconnaître une positivité trompeuse à un antigène qui ne contiendrait que du matériel-hôte.

L'utilisation de cet antigène témoin dans toute réaction de fixation du complément nous a ainsi permis de déceler une réaction inattendue entre les sérums de lapins immunisés avec des cerveaux de lapins infectés d'herpès et les antigènes herpétiques préparés sur cellules KB. Nous avons d'ailleurs retrouvé cette réaction *in vitro* entre les antigènes préparés sur cellules KB et les sérums d'animaux qui avaient reçu du matériel virulent (acellulaire) provenant de cellules de rein de lapin (herpès) ou de rein de singe (poliomyélite); notons, en passant, que l'inoculation de matériel provenant de cellules de rein de lapin, par exemple, provoque l'apparition d'un titre très faible, à peine décelable, d'anticorps dirigés contre le matériel homologue (cellules de rein de lapin normales).

Sans préjuger de la nature des relations immunologiques possibles entre des substrats d'origines aussi différentes que les cellules KB, le cerveau de lapin, les cellules de rein de lapin ou de rein de singe en culture, nous indiquerons les méthodes que nous avons utilisées pour supprimer ces réactions désignées ici comme aspécifiques et qui gênaient considérablement l'interprétation de certains de nos résultats, concernant aussi bien les antigènes herpétiques que poliomyélitiques :

épuisement des sérums par une émulsion de cellules KB normales. on ajoute à 1 ml de sérum pur un volume égal d'une émulsion très concentrée de cellules KB fraîchement préparée. On laisse en contact 24 h à + 4°, après quoi l'on centrifuge le mélange; le surnageant, correspondant au sérum épuisé (dilué au 1/2), est inactivé et essayé dans la réaction de fixation du complément. Comme on peut le constater dans le tableau VI, ce traitement permet l'élimination à peu près complète (il subsiste encore des traces d'anticorps décelables dans la première dilution du sérum) de la réaction entre le sérum immun et l'antigène témoin (du reste utilisé pur, alors que l'antigène spécifique est dilué au 1/8°).

extraction des antigènes à l'éther. l'aspect trouble - d'émulsions lipidiques - des antigènes préparés à partir de cellules KB laissant soupçonner une forte teneur en lipides, en dépit de l'absence de pouvoir anticomplémentaire, de ces émulsions, nous avons tenté de traiter celles-ci à l'éther; à un antigène préparé sur cellules KB, on ajoute un égal volume d'éther préalablement refroidi. Par agitation un gel se forme, que l'on brise par centrifugation, après séjour de 30 mn à + 4°. La phase aqueuse inférieure, séparée de la phase-éther par une couche intermédiaire, est recueillie par

aspiration à la pipette. L'éther en est éliminé par évaporation dans une cloche à vide et l'antigène est essayé par fixation du complément. (On adjoint un témoin antigène traité + hématies sensibilisées, de façon à vérifier l'absence de pouvoir hémolysant, que l'antigène pourrait acquérir au contact de l'éther). Le tableau VI met en évidence la réduction, par ce traitement, de la réaction aspécifique sérum immun-antigène témoin KB. Notons que, dans ce cas encore, l'antigène témoin est utilisé non dilué, alors qu'à la dilution correspondant à celle de l'antigène spécifique, toute réaction aspécifique est complètement supprimée. Halonen *et al.* (61) ont de même obtenu, par traitement au fréon, la suppression des réactions tissulaires homologues des antigènes Echo préparés sur cellules de rein de singe.

Par essai des antigènes herpétiques ou poliomyélitiques - avant et après traitement à l'éther - dans des réactions de fixation du complément en présence de sérums humains positifs (avec lesquels on n'a jamais observé de réaction aspécifique), on a contrôlé que ce traitement n'entraînait pas de baisse de titre de nos antigènes.

Par la suite, ceux-ci étaient traités de la manière décrite ci-dessus, et le traitement parallèle des antigènes normaux permettait d'apprécier l'efficacité du traitement.

VI - CONCLUSION

En décrivant dans ce chapitre les différentes techniques que nous avons appliquées à la préparation d'antigènes fixant le complément, nous avons voulu souligner les difficultés rencontrées dans l'obtention de ces antigènes. Nous avons abandonné les antigènes d'origine animale, pour lesquels la masse de matériel étranger était considérable au regard de celle de produit actif, au profit de ceux d'origine cellulaire plus favorables. La méthode d'extraction à partir de cellules infectées en culture, que nous avons mise au point pour l'antigène herpétique et pour l'antigène poliomyélitique, nous a fourni des antigènes de titre relativement élevé et plus purs. L'examen des tableaux I, IV et V permet d'apprécier la *sensibilité* des antigènes de diverses origines. Quant à leur *spécificité*, elle est traitée en un paragraphe spécial, «Spécificité des résultats»; nous y avons dit la rigueur avec laquelle sont examinés pouvoir anticomplémentaire et pouvoir de fixation, parfois constaté entre sérums d'animaux immunisés et antigènes témoins issus de matériel normal. L'une comme l'autre de ces réactions sont susceptibles de fausser nos résultats, et nous avons décrit quels procédés nous avons utilisés pour éliminer la seconde catégorie de celles-ci; le tableau VI donne un exemple des résultats obtenus.

Tableau VI - Réactions «aspécifiques» entre les sérums d'animaux immunisés et les antigènes témoins normaux.

		Dilutions du sérum ¹					Témoins antigènes	Témoins hémolyse
		8	16	31	64	128		
<u>Avant absorption</u>								
Antigène spécifique ²	2	4	4	4	4	1	0	
K B N	1	4	4	3	0	0	0	
Diluant		0	0	0				
<u>Après absorption</u>								
Antigène spécifique	2	4	4	4	4	0	0	
K B N	1	4	1	0	0	0	0	
Diluant		0	0	0				
<u>Avant traitement- éther</u>								
Antigène spécifique	2	4	4	4	4	2	0	
K B N	1	4	4	4	3	0	0	
Diluant		0	0	0				
<u>Après traitement- éther</u>								
Antigène spécifique	2	4	4	4	4	1	0	4
K B N	1	2	0	0			0	4
Diluant		0	0	0				4

1. Sérum du lapin 860 II immunisé avec du virus poliomyélitique type II préparé sur cellules de rein de singe.
2. Antigène de type II, préparé sur cellules K B.
La situation serait la même pour un sérum de lapin immunisé avec du matériel herpétique préparé sur cerveau de lapin ou sur cellules de rein de lapin et un antigène herpétique d'origine K B.

Nous étions alors en mesure d'étudier la relation au niveau de la cellule entre pouvoir infectieux et pouvoir antigénique. C'est à cette étude qu'est consacré le chapitre suivant.

CHAPITRE III

EVOLUTION DANS LE TEMPS DES POUVOIRS INFECTIEUX ET ANTIGENIQUES

Les expériences groupées sous ce titre ont pour but de préciser les conditions d'apparition dans le temps, d'une part de l'activité antigénique fixant le complément, d'autre part du pouvoir infectieux, et d'établir ainsi leur relation temporelle. Elles consistent donc en des prélèvements échelonnés après l'introduction du virus, et en leur titrage tant au point de vue antigénique *in vitro* (fixation du complément) qu'au point de vue infectieux.

Nous donnerons tout d'abord le protocole expérimental général de ces expériences qui fut le même dans ses grandes lignes pour le virus herpétique et pour le virus poliomyélitique.

I - MODE OPERATOIRE

Des boîtes de cultures cellulaires de même âge, présentant un tapis cellulaire continu et indemne de dégénérescence aspécifique, sont infectées, après élimination du milieu de culture, avec un volume donné de suspension virale (préalablement centrifugée). Les boîtes sont remises à l'étuve à 37°, et soumises périodiquement à un mouvement d'oscillation, de manière à permettre, au cours de la période d'adsorption, la dispersion de l'inoculum, dont le volume est en général faible.

Pour le virus herpétique, nous avons déterminé, en une expérience préliminaire, le temps optimum d'adsorption aux cellules de rein de lapin. Le pourcentage de virus adsorbé a été calculé par différence entre le titre de l'inoculum laissé au contact des cellules pendant des temps variables compris entre 2 et 6 h, et celui de ce même inoculum après séjour à l'étuve à 37° pendant des temps équivalents (contrôle rendu indispensable par la thermolabilité du virus herpétique). Le temps de 3 h finalement adopté est en accord avec les résultats de Kaplan (83) pour les cellules de rein de lapin d'une part, et de Farnham (45) pour les cellules HeLa d'autre part, qui, utilisant la méthode des plages avec ou sans gélose, disposaient d'une technique d'appréciation directe du pourcentage de virus adsorbé.

Pour les expériences III à VII du tableau X, ce temps correspond à une adsorption aux cellules de rein de lapin d'environ 70 % du virus initialement contenu dans l'inoculum.

Pour le virus poliomyélitique, ce même temps de 3 h fut initialement adopté, puis réduit à 1 h dans une seconde série d'expériences, en fonction des résultats obtenus concernant le cycle infectieux. Ces temps correspondent respectivement à une adsorption aux cellules KB d'environ 94 et 90 % du virus initial.

Après le temps d'adsorption, on élimine l'inoculum, et on lave soigneusement le tapis cellulaire deux fois avec la solution de Hanks. On introduit alors le milieu (sans sérum ou à 2,5 % de sérum de veau pour les cellules KB), et les boîtes de culture sont de nouveau incubées à 37° jusqu'au temps du prélèvement.

On procède alors de la manière suivante : le milieu de culture est prélevé, centrifugé s'il contient des cellules. Le surnageant de cette centrifugation représente la fraction S, phase liquide des cultures. Tandis que le culot cellulaire, réuni à celui obtenu par versèment du tapis cellulaire infecté, et après élimination du versène, est repris dans un volume donné de tampon au véronal et soumis à six congélations-décongélations successives. L'absence - contrôlée - d'influence sur le titre du virus de cette opération (à condition toutefois qu'elle soit limitée à six congélations : au delà, on observe une baisse de titre) permet de négliger le traitement parallèle des fractions S. Les débris cellulaires une fois éliminés, la fraction C, phase cellulaire des cultures, est prête pour les titrages.

II - TAUX D'INFECTIOSITE CELLULAIRE

C'est la quantité de virus inoculée par cellule, estimée par le rapport entre le nombre de DI₅₀ introduites au moment de l'inoculation et le nombre de cellules susceptibles d'être infectées.

$$TIC = \frac{\text{nombre de DI}_{50}}{\text{nombre de cellules}}$$

Le nombre de DI₅₀ introduites lors de chaque expérience est le produit du volume de l'inoculum par le nombre de DI₅₀ contenu dans 1 ml.

Quant au nombre de cellules, il est évalué par numération à chaque expérience d'une boîte témoin de cellules de même âge que celles destinées à l'inoculation. Les cellules sont détachées par versèment, et le nombre de noyaux est apprécié par la méthode de Sanford (134), modifiée par

Tableau VII. Nombre de cellules de rein de lapin et KB à la mise en culture et lors de l'introduction du virus.

	Boîtes de pharmacie	Boîtes de Roux	Boîtes de 3,5l.
Cellules de rein de lapin			
A l'ensemencement	9.10^6	3.10^7	15.10^7
Au 7 ^e , 10 ^e j.	8.10^5	$2,8.10^6$	20.10^6
	9.10^5	4.10^6	17.10^6
		$2,1.10^6$	
		$3,5.10^6$	
Moyenne	$8,5.10^5$	$3,1.10^6$	$18,5.10^6$
Cellules KB			
A l'ensemencement	3.10^6	10^7	5.10^7
Au 5 ^e j.	12.10^6	$2,2.10^7$	18.10^7
	12.10^6	$3,8.10^7$	20.10^7
	15.10^6	4.10^7	
	13.10^6	5.10^7	
		$4,8.10^7$	
		$4,4.10^7$	
		$4,4.10^7$	
Moyenne	13.10^6	4.10^7	19.10^7

Daniel (36), et qui consiste en une coloration des noyaux par le violet hexaméthylé à 0,01 % en solution hypotonique d'acide citrique à 3,85 %.

Nous avons groupé dans le tableau VII les résultats d'un certain nombre de ces numérations pratiquées sur des cultures de cellules de rein de lapin d'une part, et de cellules KB d'autre part. On voit que le rapport entre le nombre de cellules à leur mise en culture et celui au moment de l'inoculation, c'est-à-dire lorsque le tapis cellulaire est continu, soit entre le 7^{ème} et le 10^{ème} jour pour les cellules de rein de lapin, et entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour pour les cellules KB, est, en moyenne, de 10 à 1 pour les premières, et de 1 à 4 pour les secondes (il est environ de 5 à 1 pour les cellules de rein de singe, et de même de 1 à 4 pour les cellules HeLa).

Remarquons que ce taux d'infectiosité cellulaire reste un taux théorique et ne saurait représenter plus qu'un instrument de travail. Il n'exprime en effet que le rapport au nombre de cellules de *nombre de DI₅₀*, et non celui des *particules-virus*. D'autre part, il n'est pas corrigé en fonction du pourcentage de virus adsorbé, pourcentage du reste à peu près constant d'une expérience à l'autre pour un virus donné dans des conditions semblables. Enfin, le nombre de cellules fixées peut ne pas refléter le nombre exact de cellules sensibles à l'action du virus. Néanmoins, tel que nous l'avons défini, ce rapport nous fournit un élément de comparaison indispensable d'une expérience à l'autre.

III . MODE D'EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats définitifs sont exprimés, pour les titres infectieux par le nombre de *DI₅₀*, et pour les titres antigéniques par le nombre d'unités d'antigène fixant le complément (UAF_C), rapportés au ml, donnés en log₁₀, (0,1 ml de chacun des prélèvements étant utilisé pour les titrages).

Mais, comme nous l'avons déjà indiqué, les titres antigéniques sont toujours faibles, et ceci implique la concentration, pour en permettre l'étude, du matériel obtenu. Si cette concentration est possible, dans des proportions variables, pour le contenu de la phase cellulaire par la technique décrite au chapitre II, elle est beaucoup plus difficile pour celui de la phase liquide : on ne peut, en effet, réduire, sans porter atteinte à l'état physiologique des cellules, le volume de milieu qui les recouvre (dans lequel elles libèreront leur contenu) Un essai a été tenté pour le virus poliomyélique (expérience II du tableau XVII) Le culot cellulaire est repris dans 10 ml de diluant, et le volume de milieu recouvrant la culture réduit à 50 ml (au lieu des 500 ml habituels pour ces boîtes de capacité 3,5 l). Dans ces conditions, les boîtes doivent être soumises à l'étuve à une oscillation régulière, qui assure l'immersion du tapis cellulaire, mais n'exclut pourtant pas certaine dégénérescence aspécifique, en particulier des cellules de la

zone centrale, dégénérescence qui risque d'entraîner en définitive une baisse des titres infectieux et antigéniques. Néanmoins, le même taux de concentration n'est pas atteint pour les deux fractions, le volume de la fraction S étant de 50 ml, celui de la fraction C de 10. Il est donc indispensable, avant le tracé des courbes, et en vue de grouper les résultats des différentes expériences en une collection homogène, de corriger les titres des fractions S en fonction du rapport $\frac{\text{volume de S}}{\text{volume de C}}$, c'est-à-dire 5 pour l'expérience citée, soit une majoration de 0,7 log des valeurs logarithmiques des titres de S données au tableau XVIII.

Pour chaque expérience, nous indiquerons les volumes respectifs dans lesquels ont été recueillies les fractions S et C, et le facteur de correction qu'implique le rapport de ces volumes. C'est ainsi que pour chaque série d'expériences, les résultats seront groupés en deux ou trois tableaux, le premier correspondant aux valeurs directement obtenues ($\log_{10}$ DI₅₀ ou nombre d'UAFC par 0,1 ml), non corrigées, et le ou les suivants aux valeurs corrigées, utilisées pour le tracé des courbes.

IV - PRECISION DES TITRES INFECTIEUX

Etant donné le nombre de titrages infectieux qu'entraînaient ces expériences, nous avons cherché à connaître avec quelle précision étaient déterminés les titres infectieux selon la technique adoptée. Aussi avons-nous procédé, pour chacun des virus étudiés, à dix titrages, considérés comme titrages de référence, d'une même suspension virulente dans des conditions comparables à celles des titrages des échantillons prélevés au cours de ces expériences : même nombre d'expérimentatrices, même mode d'inoculation, même volume inoculé, même temps séparant l'exécution des dilutions des inoculations. Cet essai a été fait sur cellules de rein de lapin pour le virus herpétique, et pour le virus poliomyélitique sur cellules KB. Les résultats en sont groupés dans le tableau VIII, dans lequel sont aussi donnés variance, écart-type et erreur-type, calculés pour chacun de ces virus en fonction de ces résultats. Nous discuterons à la fin du chapitre dans quelle mesure ces données nous ont permis d'apprécier l'homogénéité de nos résultats et l'intervention de certains facteurs de variation.

V - POUVOIR INFECTIEUX ET ANTIGENIQUE DU VIRUS HERPETIQUE

Deux séries parallèles d'expériences ont été pratiquées pour étudier la formation en cultures cellulaires de l'antigène herpétique fixant le complément, sur cellules de rein de lapin d'une part, sur cellules KB d'autre part.

Tableau VIII - Précision des titres infectieux.

N° du titrage	Virus herpétique		Virus poliomyélitique	
	Titre	Ecart avec la moyenne	Titre	Ecart avec la moyenne
I	5,8	0	7,1	0,4
II	5,6	0,2	7,6	0,1
III	5,6	0,2	7,5	0
IV	5,5	0,3	7,6	0,1
V	6,1	0,3	7,8	0,3
VI	6,1	0,3	7,6	0,1
VII	6,3	0,5	7,5	0
VIII	6,1	0,3	8,4	0,9
IX	5,5	0,3	7,5	0
X	5,8	0	6,8	0,7
m	5,8		7,5	
$\sum (x-m)^2$		0,78		1,58
V	0,08		0,17	
s	0,28		0,41	
s _m	0,08		0,13	
	5,8 ± 0,08		7,5 ± 0,13	

Titre exprimé par le logarithme du nombre de DI₅₀, contenu dans 1 ml.

m moyenne des titres (moyennes des logarithmes).

$\sum (x-m)^2$ somme des carrés des écarts individuels avec la moyenne.

V variance $V = \frac{\sum (x-m)^2}{n-1}$

n = 10, nombre de titrages

n - 1 = 9, nombre de degrés de liberté

s écart-type $s = \sqrt{V}$ s_m erreur-type $s_m = \frac{s}{\sqrt{n}}$

Tableau IX - Protocole expérimental des expériences I à VII du tableau X
(virus herpétique sur cellules de rein de lapin).

Expérience n°	I	II	III	IV	V	VI	VII
Titre de l'inoculum	5,8	5,6	4,6	4,6	4,5	4,5	4,5
Volume de l'inoculum	3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Nombre de cellules	$9 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$
T I C	2,6	1/15	1/150	1/150	1/187	1/187	1/187
$\frac{\text{Volume S}}{\text{volume C}}$	30/3	50/2	50/2	50/2	50/2	50/2	50/2
Facteur de correction	1	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4

Temps d'adsorption de 3 h. à 37°.

Souches «59.3055» pour l'expérience I, «54.33» pour les autres.

Titre de l'inoculum, log DI 50/ml.

Volume de l'inoculum, en ml, T I C, taux d'infectiosité cellulaire.

Facteur de correction, log du rapport $\frac{\text{volume de S}}{\text{volume de C}}$; correction à apporter aux titres infectieux (et éventuellement antigéniques) des surnageants, donnés au tableau X.

Tableau X - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique (fixant le complément) du virus herpétique, cultivé sur cellules de rein de lapin (valeurs non corrigées).

		I		II		III		IV		V		VI		VII	
		DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC
6h	S	NF	0	-	-	0	0	-	-	0,6	0	0	0	-	-
	C	0	0	-	-	0	0	-	-	0	0	0	0	-	-
9h	S	NF	0	0,6	0	-	-	-	-	0	0	1,5	0	-	-
	C	1,5	0	0,6	0	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-
12h	S	1,6	0	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
	C	3,5	0	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
15h	S	3,5	0	-	-	1,6	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	4,5	1	-	-	2,3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
18h	S	4,5	0	3,5	0	3,3	0	2	2,6	0	2	1,6	0	-	-
	C	4,5	1	4,4	2	2,5	2	1,5	2	2,1	2	3,1	4	-	-
21h	S	4,6	0	-	-	2,6	0	2,8	0	2,8	0	-	-	-	-
	C	5,5	1	-	-	1	2	1,3	2	2,6	4	-	-	-	-
24h	S	4,3	0	3,5	0	3,5	0	3,4	0	-	-	2,5	0	3,3	0
	C	5,3	1	3,6	2	1,5	4	1,6	4	-	-	2	8	0,6	8
27h	S	4,3	0	-	-	4,1	0	-	-	-	-	3,7	0	-	-
	C	5	1	-	-	4,5	4	-	-	-	-	2,3	8	-	-
30h	S	4,6	0	3,5	0	3	0	-	-	3,4	0	3,4	0	3,4	0
	C	5,3	1	5,5	8	4,3	4	-	-	2,6	8	2,1	16	1,6	16
36h	S	3,5	0	-	-	4,8	0	5,1	0	4,6	0	4,3	0	5	0
	C	6	1	-	-	4,5	8	5,3	8	5,5	8	2,5	16	2,6	16
42h	S	5,3	0	2,3	0	2,6	1	5,3	1	-	-	4,1	0	4,5	0
	C	4,6	1	3,1	0	5,5	8	4,6	8	-	-	3,6	16	3,6	16
48h	S	4,6	0	-	-	2,6	0	-	-	4,3	0	4	0	4,3	0
	C	4,8	2	-	-	2,8	2	-	-	3,6	16	3,5	8	2,6	8
72h	S	-	-	-	-	5,3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	4,4	2	-	-	-	-	-	-	-	-
96h	S	3,5	0	-	-	3,8	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	4,5	0	-	-	4,5	4	-	-	-	-	-	-	-	-

S phase liquide (surnageant) des cultures, C phase cellulaire.

DI₅₀ pouvoir infectieux, log DI₅₀/0,1 ml

UAFC pouvoir antigénique nombre d'unités d'antigène fixant le complément dans 0,1 ml

NF non fait

A - SUR CELLULES DE REIN DE LAPIN

Les titres infectieux sont déterminés par inoculation sur cellules de rein de lapin, et les titres antigéniques par fixation du complément avec un sérum de lapin immunisé.

On trouvera résumé au tableau IX le protocole expérimental de sept expériences différentes numérotées de I à VII. L'expérience I a été faite avec le virus de la souche «59-3055» à son premier passage sur cellules de rein de lapin, et les expériences II à VII avec la souche «54-33» (17^e passage sur cellules de rein de lapin). Les résultats sont réunis dans les tableaux X, XI et XII, le premier correspondant aux valeurs brutes, les deux autres aux valeurs corrigées pour les titres des fractions S, et les courbes des figures 13 et 14 traduisent graphiquement ces résultats.

Nous examinerons en deux groupes distincts ces expériences et les courbes correspondantes :

- d'une part, l'expérience I, pour laquelle, comme on le voit au tableau IX, le taux d'infectiosité cellulaire était supérieur à 1 ;
- d'autre part, les expériences II à VII, avec un taux d'infectiosité cellulaire inférieur à 1.

Expérience I

Le taux d'infectiosité cellulaire, supérieur à 1, est égal à 2,6 et, devait théoriquement permettre l'infection simultanée de toutes les cellules et entraîner un cycle infectieux unique. On peut déceler à la 9^{ème} heure, du virus infectieux dans la phase cellulaire, et sa libération dans le surnageant se poursuit régulièrement jusqu'à la 48^{ème} heure, les deux courbes d'infectiosité correspondant d'une part au culot cellulaire, d'autre part au surnageant de culture, étant à peu près parallèles. Après une phase ascendante, qui dure jusqu'à la 21^{ème} heure, s'installe une phase en plateau régulier, avec pourtant un pic pour la fraction cellulaire, à la 36^{ème} heure (que nous retrouverons, du reste, pour les courbes suivantes), qui pourrait traduire la fin d'un cycle infectieux. Les titres élevés observés jusqu'à la fin de l'expérience (96 heures) pour cette même fraction cellulaire semblent indiquer ou que certaines cellules non atteintes initialement s'infectent progressivement, ou que le virus reste réellement intracellulaire jusqu'à ce temps avancé, ou encore que ce virus, sans être intracellulaire, est absorbé à la surface des cellules [hypothèse également soulevée par Stoker et Ross (154), qui, dans une étude de la croissance du virus herpétique sur cellules HeLa, ont inoculé sur membranes chorio-allantoïques avec résultat positif des cellules infectées - non éclatées - en suspension dans du versène].

Kaplan (83), étudiant de même la croissance du virus herpétique sur couches monocellulaires de rein de lapin, mais utilisant pour les titrages infectieux la méthode des plages, a obtenu des courbes comparables.

Scott *et al.* rapportent pour le virus herpétique cultivé sur membrane chorio-allantoïque d'oeufs embryonnés (145) ou sur cellules de cornée de lapin (144) un cycle infectieux de même allure, avec phase de latence de durée variable (4 à 12 heures), inversement proportionnelle à la concentration en virus de l'inoculum, puis une phase exponentielle pendant les dix heures suivantes.

Quant à l'antigène fixant le complément, à aucun moment, il n'est en quantité suffisante dans le surnageant pour y être décelé. Dans la fraction cellulaire, il n'apparaît qu'à la 15^{ème} heure, c'est-à-dire au cours de la phase ascendante du virus intracellulaire, mais on doit envisager que la différence de sensibilité des deux techniques mises en jeu, titrage du pouvoir infectieux d'une part, réaction de fixation du complément d'autre part, puisse être responsable de ce retard apparent. A partir de ce moment, son titre reste constant jusqu'à la 48^{ème} heure, pour s'annuler à 96 heures, lorsque les cellules, lysées pour la plupart, libèrent leur contenu dans le surnageant, c'est-à-dire dans un volume tel que l'on n'y peut déceler les faibles titres existants.

Expériences II à VII

Nous analyserons en un seul temps ces expériences, pour lesquelles le taux d'infectiosité cellulaire, inférieur à 1, était respectivement égal à 1/15 pour l'expérience II, 1/150 pour les deux suivantes, et 1/187 pour les trois dernières.

On voit, en particulier d'après la courbe de l'expérience II, que le virus est présent à la 9^{ème} heure, à la fois dans le surnageant et le culot cellulaire. Mais si pour le virus libre, après une phase ascendante de 9 heures, le titre se stabilise, à la 18^{ème} heure, la teneur en virus intracellulaire se situe à un niveau nettement inférieur, et n'atteint son maximum qu'à la 30^{ème} heure; pour tous les prélèvements compris entre 18 et 30 heures, ou 36 heures pour les expériences IV et V, et même 42 heures pour les expériences III, VI et VII, les titres du virus intracellulaire sont inférieurs à ceux du virus libre.

Quant à l'antigène fixant le complément, il n'est, comme pour l'expérience I, décelable qu'exceptionnellement dans le surnageant. Son apparition, à l'intérieur des cellules, à un titre nettement plus élevé que dans la précédente expérience, se situe autour de la 18^{ème} heure, après une ascension jusque vers la 30^{ème} heure, avec des maximaux de 80 à 160 UAFC par ml (1,9 à 2,2 log), son titre se maintient stable jusqu'à la fin de l'expérience, avec exception pour l'expérience II, pour laquelle l'annulation du titre à la 42^{ème} heure traduit probablement le passage de l'antigène dans le surnageant où on l'aurait retrouvé si l'expérience avait été prolongée.

Tableau XI - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique du virus herpétique, cultivé sur cellules de rein de lapin : expériences I à IV (valeurs corrigées).

		I			II			III			IV		
		DI ₅₀	UAFC	ECP	DI ₅₀	UAFC	ECP	DI ₅₀	UAFC	ECP	DI ₅₀	UAFC	ECP
6 h	S C	NF 0	0 0	0	- -	- -	-	0 0	0 0	0	- -	- -	-
9 h	S C	NF 25	0 0	0	3 1,6	0 0	0	- -	- -	-	- -	- -	-
12 h	S C	3,6 45	0 0	0	- -	- -	-	- -	- -	-	- -	- -	-
15 h	S C	5,5 5,5	0 1	±	- -	- -	-	4 3,3	0 1	1	- -	- -	-
18 h	S C	6,5 5,5	0 1	2	5,9 5,4	0 1,3	2	5,7 3,5	0 1,3	1	4,4 2,5	0 1,3	1
21 h	S C	6,6 6,5	0 1	2	- -	- -	-	5 2	0 1,3	1	5,2 2,3	0 1,3	1
24 h	S C	6,3 6,3	0 1	3	5,9 4,6	0 1,3	3	5,9 2,5	0 1,6	1	5,8 2,6	0 1,6	1
27 h	S C	6,3 6	0 1	3	- -	- -	-	6,5 5,5	0 1,6	1	- -	- -	-
30 h	S C	6,6 6,3	0 1	3	5,9 6,5	0 1,9	3	5,4 5,3	0 1,6	2	- -	- -	-
36 h	S C	5,5 7	0 1	4	- -	- -	-	7,2 5,5	0 1,9	3	7,5 6,3	0 1,9	3
42 h	S C	7,3 5,6	0 1	4	4,7 4,1	0 0	4	5 6,5	2,4 1,9	3	7,7 5,6	0 1,9	3
48 h	S C	6,6 5,8	0 1,3	4	- -	- -	-	5 3,8	0 1,3	4	- -	- -	-
72 h	S C	- -	- -	-	- -	- -	-	7,7 5,4	2,4 1,3	4	- -	- -	-
96 h	S C	5,5 5,5	0 0	4	- -	- -	-	6,2 5,5	2,4 1,6	4	- -	- -	-

DI₅₀ pouvoir infectieux, log DI₅₀ / ml corrigé, pour les valeurs de S, d'après le facteur de correction du tableau IX.

UAFC pouvoir antigénique, log du nombre d'unités d'antigène fixant le complément dans 1 ml, corrigé, pour les valeurs de S, d'après le facteur de correction du tableau IX.

ECP effet cytopathogène, noté sur la culture infectée, au temps du prélèvement :
± lésions à leur tout début.

1, 2, 3, 4, correspondent à une atteinte d'environ 25, 50, 75 et 100 %
(examen microscopique) des cellules (quelques cellules arrondies, formations en grappes de plus en plus nombreuses, jusqu'à la lyse totale de la nappe cellulaire).

NF non fait.

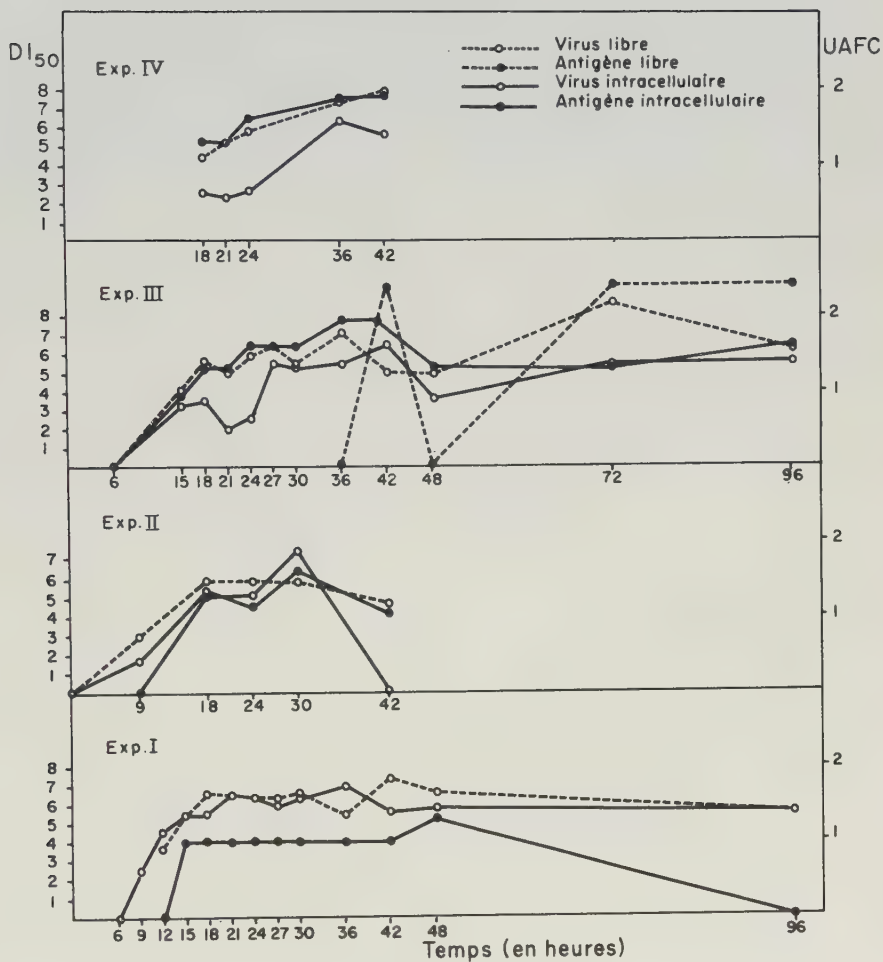


Fig. 13 - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique du virus herpétique, cultivé sur cellules de rein de lapin: expériences I à IV.

Tableau XII - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique du virus herpétique, cultivé sur cellules de rein de lapin : expériences V à VII (valeurs corrigées).

		V			VI			VII		
		DI ₅₀	UAFC	E C P	DI ₅₀	UAFC	E C P	DI ₅₀	UAFC	E C P
6h	S	3	0	0	0	0	0	-	-	-
	C	0	0		0	0		-	-	-
9h	S	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	C	0	0		-	-		-	-	-
12h	S	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	C	0	0		-	-		-	-	-
18h	S	5	0	1	4	0	±	4,7	0	±
	C	3,1	1,3		4,1	1,6		2	1,3	
21h	S	5,2	0	2	-	-	-	-	-	-
	C	3,6	1,6		-	-		-	-	-
24h	S	-	-	-	4,9	0	1	5,7	0	1
	C	-	-		3	1,9		1,6	1,9	
27h	S	-	-	-	6,1	0	2	-	-	-
	C	-	-		3,3	1,9		-	-	
30h	S	5,8	0	3	5,8	0	2	5,8	0	2
	C	3,6	2,2		3,1	2,2		2,6	2,2	
36h	S	7	0	3	6,7	0	3	7,4	0	3
	C	6,5	1,9		3,5	2,2		3,6	2,2	
42h	S	-	-	-	6,5	0	4	6,9	0	4
	C	-	-		4,6	2,2		4,6	2,2	
48h	S	6,7	0	4	6,4	0	4	6,7	0	4
	C	4,6	2,2		4,5	1,9		3,6	1,9	

DI₅₀ pouvoir infectieux, log DI₅₀ / ml corrigé, pour les valeurs de S, d'après le facteur de correction du tableau IX.

UAFC pouvoir antigénique, log du nombre d'unités d'antigène fixant le complément dans 1 ml, corrigé, pour les valeurs de S, d'après le facteur de correction du tableau IX.

ECP effet cytopathogène, noté sur la culture infectée, au temps du prélèvement : ± lésions à leur tout début

1, 2, 3, 4, correspondent à une atteinte d'environ 25, 50, 75 et 100 % (examen microscopique) des cellules (quelques cellules arrondies, formations en grappes de plus en plus nombreuses, jusqu'à la lyse totale de la nappe cellulaire).

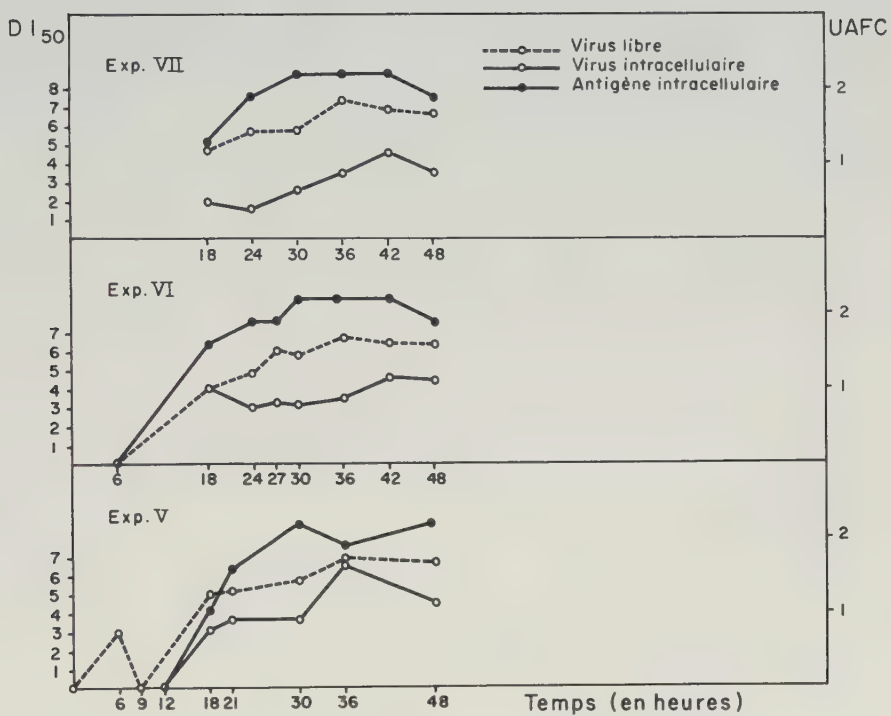


Fig. 14 - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique du virus herpétique, cultivé sur cellules de rein de lapin: expériences V à VII.

B - SUR CELLULES KB

Les titres infectieux sont déterminés par titrage sur cellules KB, et les titres antigéniques par réaction de fixation du complément, pratiquée sur sérum humain, de manière à éviter les réactions aspécifiques signalées au chapitre II, sans avoir, pour cela, à traiter à l'éther chacun des prélèvements.

Le protocole expérimental de huit expériences différentes est donné au tableau XIII. Les faibles titres obtenus par passages consécutifs du virus herpétique sur cellules KB nous a incitée à pratiquer deux séries d'expériences, l'une, la première, avec le virus de la souche «59-3055», qui avait auparavant subi trois passages consécutifs sur cellules KB, les suivantes avec les virus, de cette même souche pour l'expérience II, de la souche «54-33» pour les autres, à leur premier passage sur cellules KB. Nous discuterons plus loin les raisons possibles des difficultés à passer ce virus sur cellules KB. Indiquons maintenant que c'est en raison de l'utilisation de cellules non homologues pour la préparation de l'inoculum que nous avons donné au tableau XIII les titres respectifs des virus sur cellules KB d'une part, sur cellules de rein de lapin d'autre part; le taux d'infectiosité cellulaire a été calculé en fonction des résultats des titrages sur cellules de rein de lapin.

Les résultats sont groupés dans les tableaux XIV, XV et XVI, le premier correspondant, comme pour les expériences du paragraphe précédent, aux valeurs brutes, les suivants aux valeurs corrigées, pour les valeurs des fractions S, en fonction du facteur de correction donné au tableau XIII pour chaque expérience. Enfin, les courbes correspondant à ces huit expériences sont réunies en deux figures, les figures 15 et 16.

Plusieurs remarques s'imposent à l'examen de ces courbes.

Dans aucune expérience on n'a pu, ici, mettre en évidence d'antigène dans les surnageants.

Les titres d'antigène fixant le complément intracellulaire sont en général du même ordre, mais plusieurs fois supérieurs à ceux observés sur cellules de rein de lapin (rarement inférieurs pour les titres maximaux à 80 UAFC par ml, soit 1,9 log).

Les titres infectieux sont, par contre, régulièrement plus faibles que ceux obtenus sur cellules de rein de lapin et, en outre, pour trois expériences, III, V et VI, il y a inhibition de la libération du virus dans le surnageant : un seul prélèvement (30 ou 36 heures respectivement) s'est révélé, par titrage sur cellules KB, renfermer du virus libre; comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, ce temps, 36 heures, correspondrait à la durée d'un cycle infectieux, donc à la lyse probable des cellules qui ont subi ce premier cycle.

VI . POUVOIR INFECTIEUX ET ANTIGENIQUE DU VIRUS POLIO-MYELITIQUE

Le virus utilisé pour cette étude est un virus de type III, souche Saukett.

On trouvera résumées dans le tableau XVII les conditions dans lesquelles ces expériences ont été pratiquées, tandis que sont groupés dans les tableaux XVIII et XIX les résultats de celles-ci (valeurs non corrigées et corrigées, respectivement). Les courbes de la figure 17 donnent la représentation graphique de ces résultats.

Au tableau XVII, on voit que pour la seconde expérience seulement, le taux d'infectiosité cellulaire est supérieur à 1, mais que pour les autres, il est néanmoins supérieur à celui des expériences avec le virus herpétique.

Expériences I, III et IV

Nous analyserons ensemble ces trois expériences, étant donné la similitude des conditions expérimentales, sous la réserve que le temps d'adsorption, de 3 heures pour la première expérience, a été ensuite réduit à 1 heure pour les deux autres.

En ce qui concerne le pouvoir infectieux, des titres élevés sont très rapidement atteints, par exemple 7,3 log à 6 heures pour le virus intracellulaire de la courbe I, la phase exponentielle est pratiquement achevée à la 9^{ème} heure, et à cette phase fait suite un plateau d'allure à peu près régulière jusqu'à un stade avancé de l'expérience, ce qui pourrait indiquer, étant donné le faible taux d'infectiosité cellulaire une adsorption du virus libéré à des cellules non initialement atteintes, ou la production continue par une même cellule s'étalant sur un temps assez long.

Comme on peut le constater à l'examen de ces courbes et comme l'ont souligné Howes et Melnick (72) et Roizman *et al.* (128) étudiant la croissance du virus, les uns sur cellules de rein de singe, les autres sur cellules d'origine humaine, à tout moment les cellules renferment une quantité non négligeable de virus, au regard de celle du virus libre, contrairement à ce que l'on observe pour des virus tels que le virus de l'encéphalomyélite équine de l'Ouest, étudié en culture cellulaire par Rubin *et al.* (131).

Quant au pouvoir antigénique fixant le complément, son titre reste toujours faible, dépassant rarement 20 à 40 UAFC par ml (1,3 à 1,6 log), titres qui, comme dans le cas du virus herpétique, ne permettent de le détecter qu'exceptionnellement dans les surnageants de culture.

Il n'est pas non plus possible de noter son apparition avant celle du virus infectieux; mais, ici encore, il faut noter la différence de sensibilité des deux techniques de titrage.

Tableau XIII - Protocole expérimental des expériences I à VII du tableau XIV (virus herpétique sur cellules KB).

Expérience n°		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
titre de l'inoculum	sur KB	1,6	2,5	2,5	2,1	2,5	2,5	2,5	2,5
	sur RL	5,5	6,6	5,6	4,5	4,5	4,5	4,6	4,6
volume de l'inoculum		50	3	3	3	3	3	3	3
nombre de passages	sur KB	2	0	0	0	0	0	0	0
	sur RL	3	1	17	17	17	17	17	17
nombre de cellules		$20 \cdot 10^7$	$12 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$
T I C		1/12	1	1/33	1/416	1/416	1/416	1/333	1/333
$\frac{\text{volume S}}{\text{volume C}}$		200/10	30/3	50/2	50/2	50/2	50/2	50/2	50/2
facteur de correction		1,3	1	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4

Temps d'adsorption de 3 h. à 37° .

Souches : «59.3055» pour les expériences I et II, «54.33» pour les suivantes.

Nombre de passages : nombre de passages de l'inoculum, préalables à l'expérience, sur cellules KB d'une part, de rein de lapin (RL) d'autre part.

Facteur de correction : $\log \frac{\text{volume de S}}{\text{volume de C}}$;

correction à apporter aux titres infectieux (et éventuellement antigéniques) des surnageants, donnés au tableau XIV.

Tableau XIV - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique (fixant le complément) du virus herpétique cultivé sur cellules KB (valeurs non corrigées).

		I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII	
		DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC
6 h	S	-	-	0	0	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	0	0	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
9 h	S	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	0	0	0	1	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
12h	S	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
15h	S	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0
	C	-	-	0,8	0	-	-	0	0	-	-	-	-	0,8	0	1,5	0
16h	S	2,5	0	1,5	0	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0,8	0	0	0
	C	2,5	8	1,5	1	2,5	8	0,6	2	0	AC	0	2	2,5	0	1,8	0
21h	S	-	-	1,5	0	-	-	1,1	0	-	-	-	-	0,8	0	1,5	0
	C	-	-	1,6	1	-	-	1,5	2	-	-	-	-	2,5	2	2,5	2
24h	S	2,5	0	1,5	0	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0
	C	2,8	16	2,1	1	2,5	22	2,1	4	0,1	2	0	2	2,8	2	2,5	4
27h	S	-	-	1,5	0	-	-	1,6	0	0	0	0	0	1,5	0	2,1	0
	C	-	-	1,6	2	-	-	1,5	4	1,5	4	2,1	8	2,1	2	2,8	4
30h	S	2,6	0	1,6	0	1,5	0	1,5	0	0	0	-	-	1,1	0	1,6	0
	C	2,5	16	1,5	2	2,5	6+	1,5	16	1,6	4	-	-	2,1	2	2,5	4
36h	S	3,3	0	1,6	0	-	-	1,5	0	2,5	0	1,5	0	2,1	0	2,1	0
	C	4,1	4	2,6	2	-	-	2,5	16	2,5	8	2,5	8	2,5	8	2,5	8
42h	S	2,5	0	2,5	0	NF	NF	1,5	0	0	0	-	-	0,8	0	-	-
	C	3,8	4	2,1	2	2,6	8	2,5	8	0	2	-	-	2,6	4	-	-
48h	S	2,5	0	1,5	0	-	-	1,5	0	0	0	0	0	0,8	0	1,5	0
	C	3,5	8	2	2	-	-	1,8	2	0	4	0	4	2,5	4	2,5	8
72h	S	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	0	2,1	0
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	8	2,5	8
96h	S	2,5	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	AC	2,1	AC
	C	2,5	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	AC	2,8	AC

S phase liquide (surnageant) des cultures, C. phase cellulaire.

DI₅₀ pouvoir infectieux, log DI₅₀ / 0,1 ml.

UAFC pouvoir antigénique, nombre d'unités d'antigène fixant le complément dans 0,1 ml.

NF non fait, AC anticomplémentaire.

Tableau XV - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique du virus herpétique, cultivé sur cellules KB : expériences I à IV (valeurs corrigées)

		I			II			III			IV		
		DI ₅₀	UAFG	ECP	DI ₅₀	UAFG	ECP	DI ₅₀	UAFG	ECP	DI ₅₀	UAFG	ECP
6 h	S	-	-	-	0	0	0	-	-	-	0	0	0
	C	-	-	-	0	0	0	-	-	-	0	0	0
9 h	S	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	-	-	-	0	0	0	0	1	0	0	0	0
12h	S	-	-	-	0	0	0	-	-	-	0	0	0
	C	-	-	-	0	0	0	-	-	-	0	0	0
15h	S	-	-	-	0	0	0	-	-	-	0	0	0
	C	-	-	-	1,8	0	0	-	-	-	0	0	0
18h	S	4,6	0	±	3,5	0	±	0	0	2	3,7	0	1
	C	3,5	1,9	±	2,5	1	±	3,5	1,9	2	1,6	1,3	1
21h	S	-	-	-	3,5	0	1	-	-	-	3,5	0	1
	C	-	-	-	2,8	1	1	-	-	-	2,5	1,3	1
24h	S	4,6	0	1	3,5	0	1	0	0	3	3,9	0	1
	C	3,5	2,2	1	3,1	1	1	3,5	2,5	3	3,1	1,6	1
27h	S	-	-	-	3,3	0	2	-	-	-	4	0	2
	C	-	-	-	2,6	1,3	2	-	-	-	2,5	1,6	2
30h	S	4,9	0	2	3,6	0	2	3,9	0	4	3,9	0	3
	C	4,3	2,2	2	2,5	1,3	2	3,5	2,6	4	2,5	2,2	3
36h	S	5,6	0	3	3,6	0	3	-	-	-	3,9	0	3
	C	5,1	1,6	3	3,8	1,3	3	-	-	-	3,5	2,2	3
42h	S	4,8	0	4	4,5	0	4	NF	NF	4	3,9	0	4
	C	4,5	1,6	4	4,1	1,3	4	3,6	1,9	4	3,5	1,9	4
48h	S	4,8	0	4	3,5	0	4	-	-	-	3,9	0	4
	C	4,5	1,9	4	3	1,3	4	-	-	-	2,8	1,5	4
96h	S	4,8	0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	3,5	1,6	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DI₅₀ pouvoir infectieux, log DI₅₀ /ml , corrigé, pour les valeurs de S, d'après le facteur de correction du tableau XIII.

UAFG pouvoir antigénique, log du nombre d'unités d'antigène fixant le complément dans 1 ml , corrigé, pour les valeurs de S, d'après le facteur de correction du tableau XIII.

ECP effet cytopathogène, noté sur la culture infectée, au temps du prélèvement:
± lésions à leur début : amas de cellules plus réfringentes.

1, 2, 3, 4, différents stades d'atteinte cellulaire correspondant, à l'examen microscopique, à un nombre de plus en plus grand de cellules arrondies, restant groupées, et dégénérescence progressive du tapis cellulaire.

NF non fait.

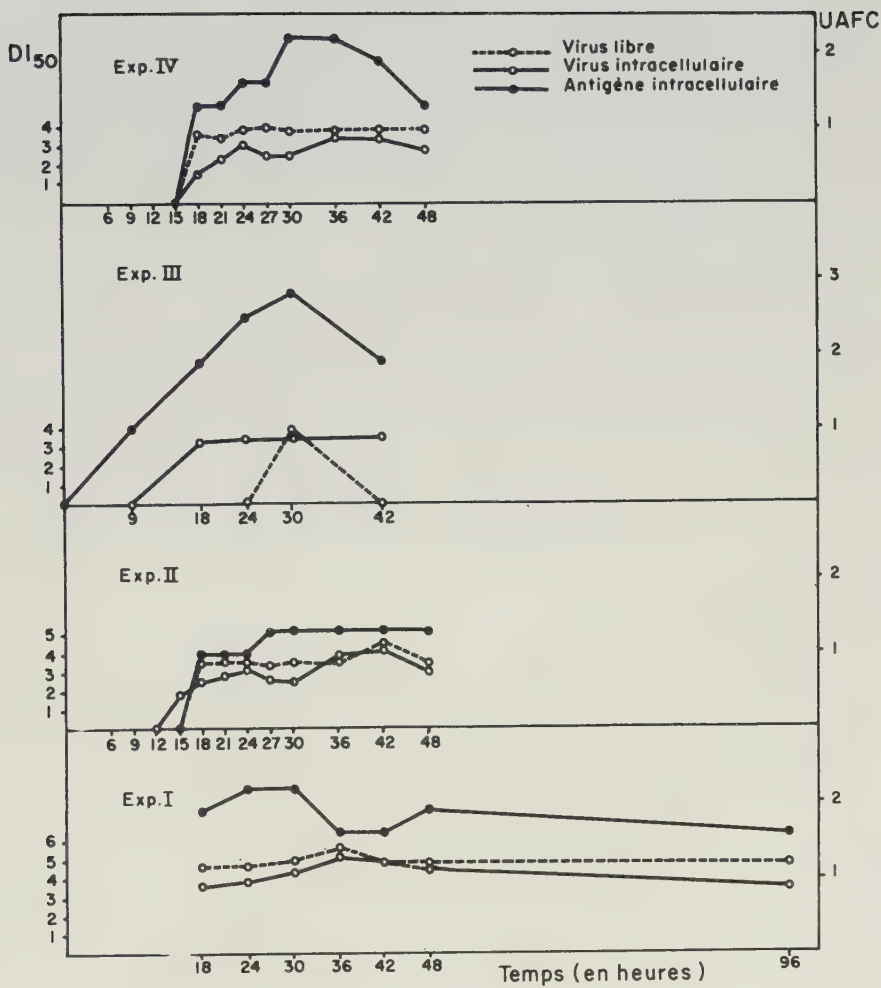


Fig. 15 - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique du virus herpétique, cultivé sur cellules KB: expériences I à IV.

Tableau XVI - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique du virus herpétique cultivé sur cellules KB : expériences V à VIII (valeurs corrigées).

		V			VI			VII			VIII		
		DI ₅₀	UAFc	ECP	DI ₅₀	UAFc	ECP	DI ₅₀	UAFc	ECP	DI ₅₀	UAFc	ECP
6h	S C	0 0	0 0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9h	S C	0 0	0 0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15h	S C	- -	- -	-	-	-	-	0 1,8	0 0	0	0 2,3	0 0	0
18h	S C	0 0	0 1,3	±	0 0	0 1,3	±	3,2 3,5	0 0	±	0 2,8	0 0	±
21h	S C	- -	- -	-	-	-	-	3,2 3,3	0 1,3	±	3,7 3,5	0 1,3	±
24h	S C	0 1,1	0 1,3	1	0 0	0 1,3	1	0 3,8	0 1,3	1	3,2 4,5	0 1,6	1
27h	S C	0 2,5	0 1,6	2	0 3,1	0 1,9	2	3,7 4,1	0 1,3	1	4,5 3,8	0 1,6	1
30h	S C	0 2,6	0 1,6	2	-	-	-	3,5 4,1	0 1,3	2	4 4,5	0 1,6	2
36h	S C	4,7 3,3	0 1,9	3	3,9 3,3	0 1,9	3	4,5 4,3	0 1,9	2	4,5 4,5	0 1,9	2
42h	S C	0 0	0 1,3	1	-	-	-	3,2 3,6	0 1,6	2	-	-	-
48h	S C	0 0	0 1,6	1	0 0	0 1,6	1	3,2 3,5	0 1,6	3	3,9 3,3	0 1,9	3
73h	S C	- -	- -	-	-	-	-	4,9 4,1	0 1,9	4	4,5 3,5	0 1,9	4
96h	S C	- -	- -	-	-	-	-	3,9 3,5	AC AC	4	4,5 3,8	AC AC	4

DI₅₀ pouvoir infectieux, log DI₅₀ /ml ,et corrigé, pour les valeurs de S, d'après le facteur de correction du tableau XIII.

UAFc pouvoir antigénique, log du nombre d'unités d'antigène fixant le complément dans 1ml , corrigé, pour les valeurs de S, d'après le facteur de correction du tableau XIII.

ECP effet cytopathogène, noté sur la culture infectée au temps du prélèvement.

± lésions à leur début : amas de cellules plus réfringentes.

1, 2, 3, 4, différents stades d'atteinte cellulaire correspondant, à l'examen microscopique, à un nombre de plus en plus grand de cellules arrondies, restant groupées, et dégénérescence progressive du tapis cellulaire.

AC anticomplémentaire.

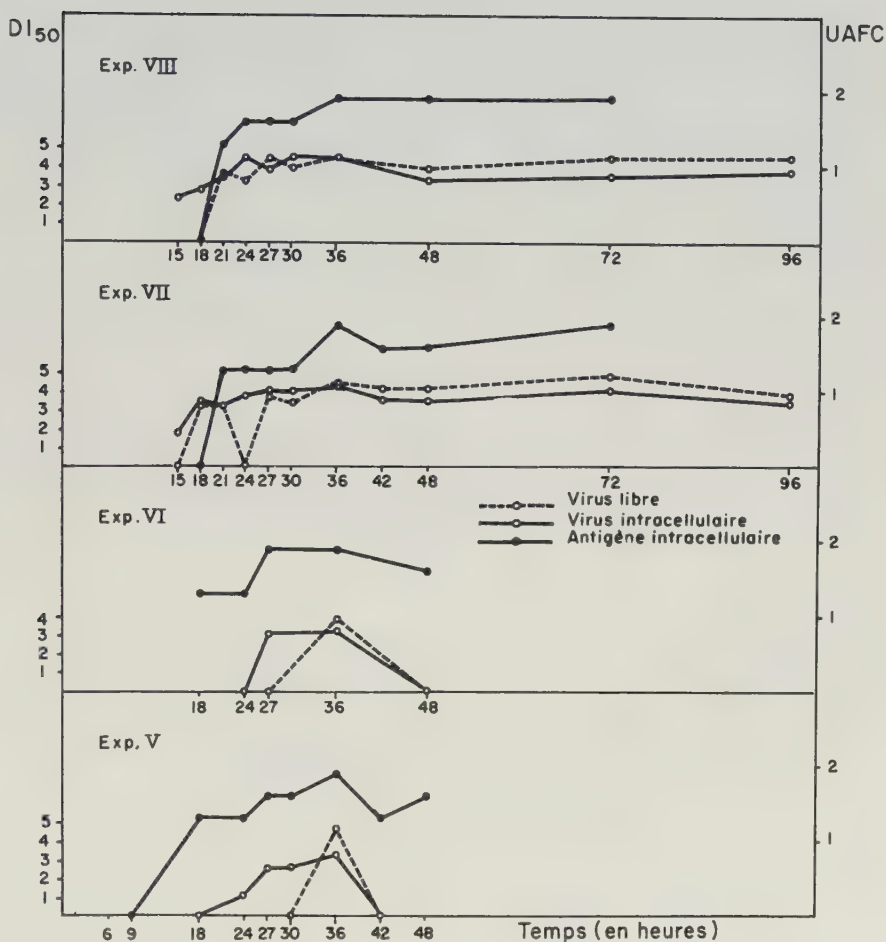


Fig. 16 - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique du virus herpétique, cultivé sur cellules KB: expériences V à VIII.

Tableau XVII - Protocole expérimental des expériences I à IV du tableau XVIII
(virus poliomyélitique).

Expérience n°	I	II	III	IV
Titre de l'inoculum	6,6	7,8	7,5	7,5
volume de l'inoculum	1	12	0,25	0,25
Temps d'adsorption	3h	3h	1h	1h
Nombre de cellules	$12 \cdot 10^6$	$20 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$
T I C	$1/3$	3,8	$1/5$	$1/5$
Volume S volume C	$50/3$	$50/10$	$50/2$	$50/2$
Facteur de correction	1	0,7	1,4	1,4

Titre de l'inoculum, $\log DI_{50}/ml$.
 Volume de l'inoculum, en ml, T I C, taux d'infectiosité cellulaire.
 Facteur de correction, $\log$ du rapport $\frac{\text{volume de S}}{\text{volume de C}}$;
 correction à apporter aux titres infectieux (et éventuelle-
 ment antigéniques) des surnageants, donnés au tableau
 XIX.

Tableau XVIII - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique (fixant le complément) du virus poliomyélitique (valeurs non corrigées).

		I		II		III		IV	
		DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	UAFC
3 h	S	-	-	-	-	2,1	0	3,1	0
	C	-	-	-	-	1,8	0	2,2	0
6 h	S	2,8	0	-	-	3,5	0	2,3	0
	C	6,5	1	-	-	6,1	0	5,6	0
9 h	S	5	0	-	-	5,5	0	6,6	0
	C	6,8	1	-	-	6,8	0	6,8	1
12 h	S	5,1	0	-	-	-	-	-	-
	C	6,8	1	-	-	-	-	-	-
15 h	S	4,6	0	-	-	6,1	0	6,6	0
	C	6,7	1	-	-	7,5	1	7,5	1
18 h	S	5,5	0	7,5	1	6,6	0	6,5	0
	C	6,8	1	8,5	2	7,5	2	7,5	2
21 h	S	5,1	0	6,6	1	6,6	0	6,5	0
	C	7,3	2	7,6	4	7,5	2	7,8	4
24 h	S	5,5	0	7,5	1	6,6	0	6,6	0
	C	7,5	2	7,6	2	7,5	4	7,6	4
27 h	S	-	-	-	-	6,8	0	6,6	0
	C	-	-	-	-	7,6	2	6,6	2
30 h	S	5,5	0	7,1	AC	6,3	0	6,6	0
	C	6,5	1	7,5	2	7,5	4	7,6	2
36 h	S	5,8	0	-	-	-	-	-	-
	C	6,1	0	-	-	-	-	-	-
42 h	S	-	-	-	-	7	0	6,8	0
	C	-	-	-	-	7,5	2	6,6	2
48 h	S	5,8	0	7,5	AC	7,1	0	6,1	0
	C	6,1	0	6,5	1	8,5	2	7,5	2
72 h	S	-	-	-	-	6,5	0	6	0
	C	-	-	-	-	7,2	2	7,5	2
96 h	S	-	-	7,1	1	6,3	0	5,1	0
	C	-	-	6,5	1	6,5	1	6,5	1

S phase liquide (surnageant) des cultures, C phase cellulaire.
 DI₅₀ pouvoir infectieux, log DI₅₀ / 0,1 ml
 UAFC pouvoir antigénique, nombre d'unités d'antigène fixant le complément dans 0,1 ml.
 AC anticomplémentaire.

Tableau XIX - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique du virus poliomyélitique (valeurs corrigées).

		I			II			III			IV		
		DI ₅₀	UAFC	ECP	DI ₅₀	UAFC	ECP	DI ₅₀	UAFC	ECP	DI ₅₀	UAFC	ECP
3 h	S	-	-	-	-	-	-	4,5	0	0	5,5	0	0
	C	-	-	-	-	-	-	2,8	0	0	3,2	0	0
6 h	S	4,8	0	0	-	-	-	5,9	0	0	4,7	0	0
	C	7,5	1	0	-	-	-	7,1	0	0	6,6	0	0
9 h	S	7	0	2	-	-	-	7,9	0	2	9	0	2
	C	7,8	1	0	-	-	-	7,8	0	0	7,8	1	0
12h	S	7,1	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	7,8	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15h	S	6,6	0	4	-	-	-	8,5	0	3	9	0	3
	C	7,7	1	0	-	-	-	8,5	1	0	8,5	1	0
18h	S	7,5	0	4	9	1,7	4	9	0	4	8,5	0	4
	C	7,8	1	0	9,5	1,5	0	8,5	1,5	0	8,5	1,5	0
21h	S	7,1	0		8,5	1,7		9	0		8,9	0	
	C	6,5	1,5		8,6	1,6		8,3	1,3		8,8	1,6	
24h	S	7,3	0		9	1,7		9	0		9	0	
	C	8,5	1,5		8,6	1,5		8,5	1,6		8,6	1,6	
27h	S	-	-	-	-	-	-	9,2	0		9	0	
	C	-	-	-	-	-	-	8,6	1,5		7,6	1,3	
30h	S	7,5	0		8,8	AC		8,7	0		9	0	
	C	7,5	1		8,5	1,5		8,5	1,6		8,6	1,3	
36h	S	7,8	0		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	7,1	0		-	-	-	-	-	-	-	-	-
42h	S	-	-	-	-	-	-	9,4	0		9,2	0	
	C	-	-	-	-	-	-	8,4	1,5		7,6	1,3	
48h	S	7,8	0		9,2	AC		9,5	0		8,5	0	
	C	7,1	0		7,5	1		9,5	1,5		8,5	1,5	
72h	S	-	-		-	-	-	8,9	0		8,4	0	
	C	-	-		-	-	-	8,2	1,5		8,5	1,3	
96h	S	-	-		8,8	1,7		8,7	0		7,5	0	
	C	-	-		7,5	1		7,5	1		7,5	1	

DI₅₀ pouvoir infectieux, log DI₅₀/ml, corrigé, pour les valeurs de S, d'après le facteur de correction du tableau XVIII.

UAFC pouvoir antigénique, log, du nombre d'unités d'antigène fixant le complément dans 1 ml, et corrigé éventuellement pour les valeurs de S d'après le facteur de correction du tableau XVIII.

ECP effet cytopathogène, observé au temps du prélèvement sur les boîtes en culture.

2, 3, 4, différents stades d'atteinte du tapis cellulaire correspondant à approximativement 50, 75, et 100 % de cellules lésées.

Au-delà de 18 h., la nappe cellulaire est entièrement lésée, et les cellules, toutes, détachées du verre.

AC anticomplémentaire.

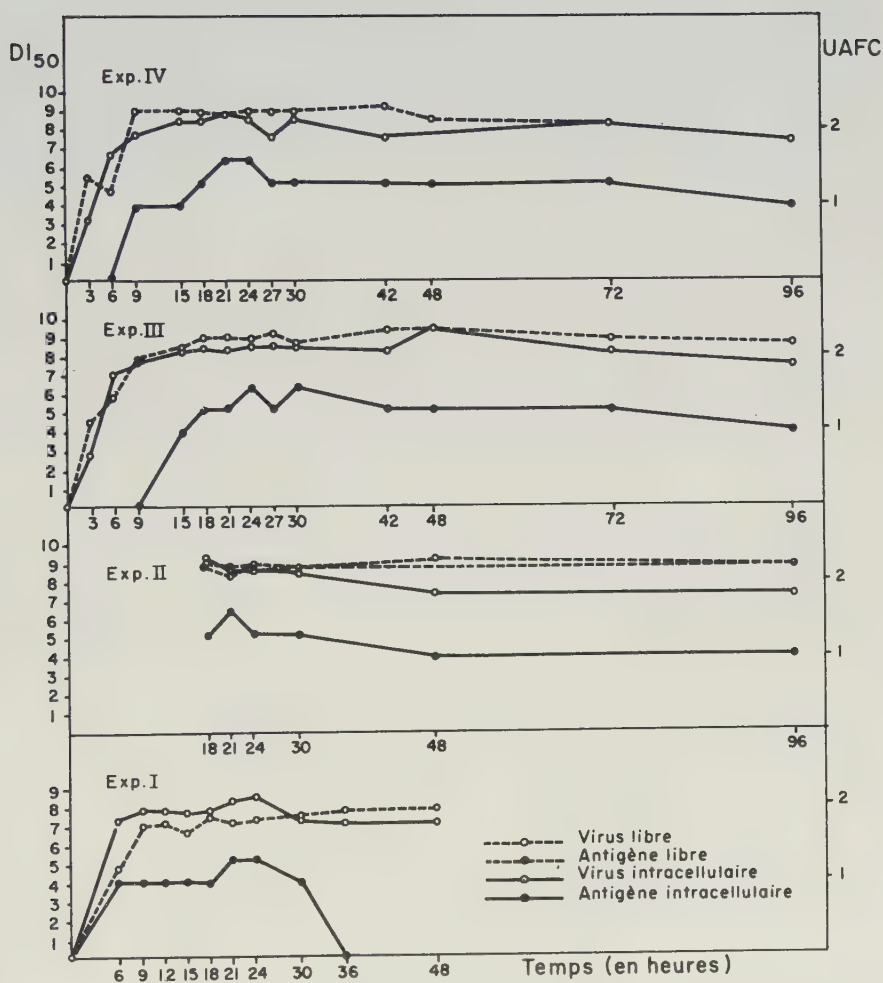


Fig. 17 - Evolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique du virus poliomyélitique.

Après une augmentation progressive, son titre passe par un maximum entre la 21^{ème} et la 24^{ème} heure, puis décroît, ce qui laisse à penser que la lyse des cellules entraîne alors son passage dans le sumageant. Les résultats de l'expérience II permettent de confirmer cette hypothèse.

Expérience II

Dans cette expérience, comme nous l'avons déjà indiqué, nous avons voulu réduire le volume du sumageant de culture, donc concentrer son contenu. On voit que, dans ces conditions, les courbes correspondant au virus libre d'une part, et intracellulaire d'autre part, se coupent et que le point d'intersection se situe autour de la 24^{ème} heure, temps qui correspond pour nos autres expériences à l'amorce de la baisse du titre antigénique observée dans les culots cellulaires.

VII - DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons donné dans le tableau VIII les valeurs des variance, écart-type et erreur-type, caractéristiques des titrages du virus herpétique sur cellules de rein de lapin, du virus poliomyélitique sur cellules KB.

Procédant à l'analyse statistique des résultats obtenus au cours de l'étude qui précède tant pour le virus herpétique sur cellules de rein de lapin que pour le virus poliomyélitique sur cellules KB, nous avons comparé les variances du tableau VIII aux variances générales estimées pour chacun de ces virus, pour les prélèvements correspondant, d'une part à la phase liquide S des cultures, et d'autre part à la phase cellulaire C.

Nous tenons à remercier M. S. Ledermann de l'Institut National d'Etudes Démographiques, à qui nous devons cette analyse, de l'intérêt qu'il a bien voulu prendre à notre travail, et de l'aide qu'il nous a ainsi apportée.

La variance générale V_S pour les sumageants de culture est calculée de la manière suivante :

$$V_S = \frac{(x_{i1} - m_1)^2 + (x_{i2} - m_2)^2 + \dots (x_{in} - m_n)^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots (n_n - 1)}$$

$(x_{i1} - m_1)^2, (x_{i2} - m_2)^2, \dots (x_{in} - m_n)^2$, représentant la somme des carrés des écarts avec la moyenne à l'intérieur de chaque groupe de prélèvements pour un temps donné (3 heures, 6 heures, 9 heures, etc...) des différentes expériences comparables entre elles,
 $n_1, n_2, \dots n_n$, le nombre d'observations indépendantes à l'intérieur de chacun de ces groupes.

De même pour la variance générale V_C , estimée à partir des titres infectieux des culots cellulaires C.

C'est ainsi que pour le virus herpétique, en fonction des résultats donnés aux tableaux XI, XII et XXI (celui-ci fournissant les valeurs moyennes) des expériences III à VIII, on a les variances V_S et V_C suivantes, calculées d'après les titrages des observations comprises entre 18 et 48 h :

$$V_S = \frac{8,73}{23} = 0,37 \text{ et } V_C = \frac{23,44}{23} = 1,01$$

Le test F de Snédécour (93) nous permet la comparaison deux à deux des variances V (du tableau VIII) et V_S , et V et V_C , fournies par les titrages de N, N_S ou N_C observations indépendantes.

Les rapports

$$F_S = \frac{V_S}{V} \text{ et } F_C = \frac{V_C}{V}$$

nous permettent de calculer les valeurs de F.

$$F_S = \frac{0,37}{0,08} = 4,6 \quad F_C = \frac{1,01}{0,08} = 12,6$$

Les tables numériques de F donnent pour $l_S = 23$ et $l = 9$ degrés de liberté, et pour un seuil de sécurité 0,01, 4,7 ; on voit que la limite que F n'a qu'une chance sur 100 de dépasser par un effet du hasard n'est pas franchie, donc que la différence entre les deux variances n'est pas significative ; autrement dit, que les variations observées entre les titres des expériences III à VII (à l'intérieur d'un même groupe) sont dues aux seules erreurs d'expérimentation, et que la précision obtenue n'est pas différente de celle que l'on peut attendre de la méthode de titrage utilisée.

Par contre, il n'en est pas de même pour la variance V_C , estimée d'après les titres obtenus pour les culots cellulaires C, et il faut admettre ici l'existence de facteurs de variation, autres que ceux inhérents à la méthode de titrage elle-même. Parmi ceux-ci, nous pensons que deux surtout sont à envisager, dont l'influence est difficile à évaluer, mais n'est certainement pas négligeable :

-- celui concernant l'utilisation d'une boîte de culture différente à chaque prélèvement ; la nécessité de concentrer, pour l'étudier, le matériel antigénique, rend ce procédé indispensable, mais risque d'entraîner des irrégularités éventuelles dans le nombre de cellules productrices de matériel viral, et, de ce fait, dans les titres obtenus. Pourtant cette cause de variation peut être responsable, de la même manière, d'écarts dans les titres des surnageants.

— mais à un second facteur est probablement imputable la plus forte partie des variations constatées entre les titres des culots cellulaires C : c est la thermolabilité du virus herpétique, le nombre de manipulations préalables aux titrages des fractions recueillies pouvant amener des baisses de titres difficilement contrôlables, en dépit des précautions prises pour les éviter.

Les résultats obtenus pour le virus poliomyélitique, selon le même mode de calcul et en fonction des valeurs des expériences III et IV des tableaux XX et XXI, semblent confirmer cette hypothèse.

On a, en effet, pour

$$V_S = \frac{3,22}{13} = 0,24 \quad V_C = \frac{1,85}{13} = 0,14$$

La comparaison des variances V_S et V d'une part, et V_C et V d'autre part, donne pour F

$$F_S = \frac{0,24}{0,17} = 1,4 \quad F_C = \frac{0,17}{0,14} = 1,2$$

Pour $1_S = 13$ et $1 = 9$, on trouve dans la table pour F , pour un seuil de sécurité 0,05, la valeur 3,05. On voit que V_S et V ne diffèrent pas significativement, la valeur calculée de F étant nettement inférieure à la valeur théorique.

De même pour $1 = 9$ et $1_C = 13$, V_C étant plus petite que V , contrairement aux cas précédents, la valeur théorique donnée par la table est 2,72, seuil de sécurité 0,05, le rapport F trouvé est inférieur à la limite.

Nous commenterons maintenant les principaux résultats des expériences rapportées dans ce chapitre.

A l'examen des courbes des figures 13 et 14 concernant *le virus herpétique sur cellules de rein de lapin*, on doit noter :

— le décalage — apparemment paradoxal — entre les titres infectieux du virus libre et ceux du virus intracellulaire, toujours plus élevés pour les premiers. Les prélèvements initiaux étant négatifs, le virus résiduel de l'inoculum n'est pas en cause. Il s'agit donc bien de virus nouvellement formé.

La libération continue de virus (qui permet de maintenir son titre à un niveau constant, en dépit de l'inactivation thermique) peut être concomitante avec la production et l'accumulation de virus intracellulaire, comme c'est le cas pour le virus grippal ainsi que l'a montré Uhlendorf (161),

cité par Ackermann (1), accumulation qui se poursuivrait jusque vers la 36^{ème} heure. Ce temps - 36 heures - pourrait correspondre à la durée d'un cycle infectieux. Dans un cas, expérience III, où l'expérience a été prolongée au delà de 48 heures, l'apparition d'un second pic infectieux à la 72^{ème} heure confirme cette hypothèse, [Les cellules non initialement atteintes ayant pu subir un cycle d'infection secondaire, en s'infectant soit par le virus libéré dans le surnageant, soit par contact avec des cellules adjacentes infectées. Stoker (152) et Black et Melnick (15) ont prouvé la réalité de ce mode de contagion pour le virus herpétique et un virus voisin, le virus B du singe].

Mais on peut encore envisager que la maturation d'un certain nombre de particules infectieuses est retardée jusqu'à ce temps - 36 heures - et que ce retard est le résultat de l'interférence exercée par les particules virales libérées dans le surnageant et progressivement inactivées dans une proportion non négligeable pour un virus aussi thermolabile que le virus herpétique [Farnham et Newton (46)]. Cette interférence s'accompagnerait de la production d'une substance inhibitrice assimilable soit à l'interféron, découvert par Isaacs et Lindenmann (80), soit aux produits voisins étudiés par Ho et Enders (69, 70), Chany *et al.* (31), Chany (29, 30) et Pereira (116). Mais l'agent interférant pourrait être l'antigène fixant le complément lui-même.

d'autre part les titres d'antigène fixant le complément sont d'autant plus élevés que le taux d'infectiosité cellulaire est plus faible. Un tel taux, comme celui des expériences II à VII des figures 13 et 14 permet l'établissement de l'interférence. Par contre, pour l'expérience I, un taux d'infectiosité cellulaire supérieur à 1 doit assurer l'infection simultanée de toutes les cellules sensibles.

A propos des courbes des figures 15 et 16 correspondant au *virus herpétique sur cellules KB*, on remarquera que :

- les titres infectieux sont toujours plus faibles que sur cellules de rein de lapin ; pour trois expériences, le virus infectieux est même absent des surnageants de culture, à l'exception des prélèvements de 30 ou 36 heures.
- l'apparition du virus dans la phase cellulaire est en général plus tardive que sur cellules de rein de lapin.
- les titres d'antigène fixant le complément sont, d'autre part, souvent supérieurs à ceux constatés sur cellules de rein de lapin.
- de plus, pour les trois expériences, où l'on n'a pas mis en évidence de virus dans le surnageant, l'antigène est présent dans la phase cellulaire avant le virus infectieux.

La différence entre les titres d'un même inoculum sur cellules KB d'une part et sur cellules de rein de lapin d'autre part (tableau XIII) laissait

Tableau X X - Influence sur la virulence du virus herpétique de passages successifs sur cellules KB.

Inoculum (17° passage RL)	titré sur RL ¹	4,5
	KB ²	2,5
1° passage KB		
TIC ³ 1/312		
Contact 3h - 37° 2 lavages		
ECP ⁴ +		
Virus total ⁵ recueilli à la 48° h,	titré sur RL	5,5
	KB	2,5
2° passage KB		
TIC 1/12		
ECP 0		
Virus total recueilli à la 96° h,	titré sur RL	4,5
	KB	0

1. cellules de rein de lapin, 2. cellules KB.
 3. taux d'infectiosité cellulaire, 4. effet cytopathogène
 5. virus centrifugé après une congélation-décongélation

Titres infectieux, log DI₅₀ / ml.

déjà soupçonner ou une différence de sensibilité de ces deux types de cellules au virus herpétique, ou une modification de la synthèse du virus par passage sur cellules KB. En effet une altération dans la production de virus sur ces cellules peut rendre difficile l'expression exacte des titres infectieux du virus produit, les titrages représentant pour le virus en cause un passage supplémentaire sur ces mêmes cellules. Les résultats de deux expériences similaires, résumées dans le tableau XX, semblent confirmer l'hypothèse de l'altération sur cellules KB de la synthèse du virus et des modifications progressives amenées par passages consécutifs du virus sur ces cellules. On voit qu'après deux passages sur cellules KB, au troisième (titrage du résultat du deuxième passage), il n'est plus possible de mettre en évidence le virus infectieux, alors que le titre obtenu sur cellules de rein de lapin, 4,5 log, bien qu'inférieur d'1 log au titre de l'inoculum, permette de conclure à la présence de virus dans des cellules qui pourtant n'avaient manifesté aucun effet cytopathogène. Ces résultats sont à rapprocher de la différence de titre, indiquée au tableau XIII, d'un même virus, celui de la souche «59-3055» des expériences I et II, à son premier et à son troisième passage sur cellules KB, 2,5 et 1,6 log par titrage sur cellules KB, et 6,6 et 5,5 log sur cellules de rein de lapin respectivement.

Stoker et Ross (154), étudiant la croissance du virus herpétique sur cellules HeLa (comme les cellules KB, d'origine cancéreuse) soulignent le mauvais rendement obtenu dans la production du virus sur ces cellules, que confirme leur étude au microscope électronique (155). Des expériences non publiées de Ceolin (28), qui a observé l'«extinction» progressive de plusieurs souches de virus herpétique par passages consécutifs sur cellules HeLa, vont dans le même sens.

L'hypothèse formulée par Lieberman et Friedman (98) dans une étude sur l'antigène fixant le complément des adénovirus, et par Stoker (153), de l'interférence avec la production de virus infectieux de particules non infectieuses contenues dans l'inoculum et qui s'adsorberaient aux cellules sensibles, semble devoir être écartée dans nos expériences sur cellules KB par la comparaison des titres infectieux d'un même inoculum sur cellules de rein de lapin et sur cellules KB à son premier passage : les titres obtenus sur cellules de rein de lapin indiquent que c'est, *au-delà du stade de l'adsorption*, à l'intérieur même des cellules KB, qu'apparaît une modification dans la production du virus.

L'altération de la synthèse du virus sur cellules KB, sans que soient en cause les facteurs, ou physiques, température et pH, ou nutritifs, dont Farnham et Newton (46) d'une part, et Pelmont et Morgan (115) d'autre part, ont noté l'importance pour la croissance du virus herpétique, conduit à envisager ici aussi l'intervention d'interféron. Mais il s'agirait alors d'une substance de type interféron plutôt que de l'interféron lui-même.

En effet, d'une part, le virus herpétique est un des moins sensibles, parmi les virus jusqu'ici étudiés, à l'action de l'interféron [Isaacs (77), Ho et Enders (70)]. D'autre part, la baisse de pouvoir infectieux s'accompagne non pas d'une baisse de pouvoir antigénique fixant le complément comme c'est le cas pour le virus grippal (79) ou les adénovirus (116), mais au contraire d'une augmentation de celui-ci.

- cependant, en l'absence de toute substance inhibitrice, il pourrait y avoir interaction directe entre le virus infectieux et l'antigène lui-même. Le phénomène observé ne serait ainsi pas très différent de celui constaté sur cellules de rein de lapin. La différence ne serait pas qualitative, mais quantitative : par suite d'une particularité dans le métabolisme des cellules KB infectées par le virus herpétique, le processus normal de synthèse du virus étant modifié et dévié vers la production d'antigène plutôt que de virus infectieux.

L'examen de la courbe 17 pour le *virus poliomyélitique sur cellules KB* permet de constater que :

- les titres infectieux sont régulièrement élevés ; les courbes traduisant l'évolution du virus intracellulaire et du virus libre sont parallèles.
- par contre, les titres antigéniques sont régulièrement faibles, par opposition aux titres infectieux élevés, caractéristiques du virus poliomyélitique.

Le parallélisme des courbes correspondant à l'évolution du virus et de l'antigène intracellulaires souligne la relation entre le pouvoir infectieux et le pouvoir antigénique de ce virus au *stade intracellulaire*. Cette relation pourrait donc là encore se situer au niveau de la synthèse de leurs éléments constitutifs. Cependant l'antigène jusqu'à 24 heures s'accumule dans la cellule sans qu'en soient modifiées la production et la libération du virus infectieux, contrairement à ce que nous avons vu pour le virus herpétique.

La figure 18 donne les courbes établies d'après les valeurs moyennes du tableau XXI et correspondant aux expériences III à VII pour ce même virus sur cellules KB, et pour le virus poliomyélitique aux expériences III et IV.

L'ensemble des résultats que nous venons de discuter incite à considérer l'antigène fixant le complément comme un *constituant intracellulaire* obligatoire qui ne serait libéré que par l'éclatement des cellules, que celui-ci fût provoqué (congélations - décongélations par exemple) ou spontané (autolyse à 37°).

Tableau XXI - Moyennes des résultats.

	Virus herpétique						Virus poliomyélitique		
	sur cellules de RL			sur cellules KB					
	S	C		S	C		S	C	
	DI ₅₀	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	DI ₅₀	UAFC	DI ₅₀	DI ₅₀	UAFC
3 h	-	-	-	-	-	-	5	3	0
6 h	0	0	0	0	0	0	5,3	6,8	0
9 h	0	0	0	0	0	0	8,4	7,8	0,5
12h	0	0	0	0	0	0	-	-	-
15h	4	3,3	1	0	2	0	8,7	8,4	1
18h	4,7	3	1,3	1,1	1,8	0,9	8,9	8,5	1,3
21h	5,1	2,6	1,4	3,4	3	1,3	8,9	8,5	1,4
24h	5,5	2,4	1,7	1,1	2,6	1,6	9	8,5	1,6
27h	6,3	4,4	1,7	2,4	3,2	1,6	9,1	8,1	1,3
30h	5,7	3,6	2	3	3,4	1,9	8,8	8,5	1,4
36h	7,1	5	2	4,3	3,8	1,9	-	-	-
42h	6,5	5,3	2	2,3	2,7	1,6	9,3	8	1,3
48h	6,2	4,1	1,8	2,2	1,9	1,6	9	9	1,3
72h	7,7	5,4	1,3	4,7	3,8	1,9	8,6	8,3	1,3
96h	6,2	5,5	1,6	4,2	3,6	-	8,1	7,5	1

Moyennes des résultats

- des expériences III à VII, pour le virus herpétique cultivé sur cellules de rein de lapin (RL) : valeurs des tableaux XI et XII.
- des expériences III à VIII, pour le virus herpétique cultivé sur cellules KB : valeurs de tableaux XV et XVI.
- des expériences III et IV, pour le virus poliomyélitique : valeurs du tableau XX.

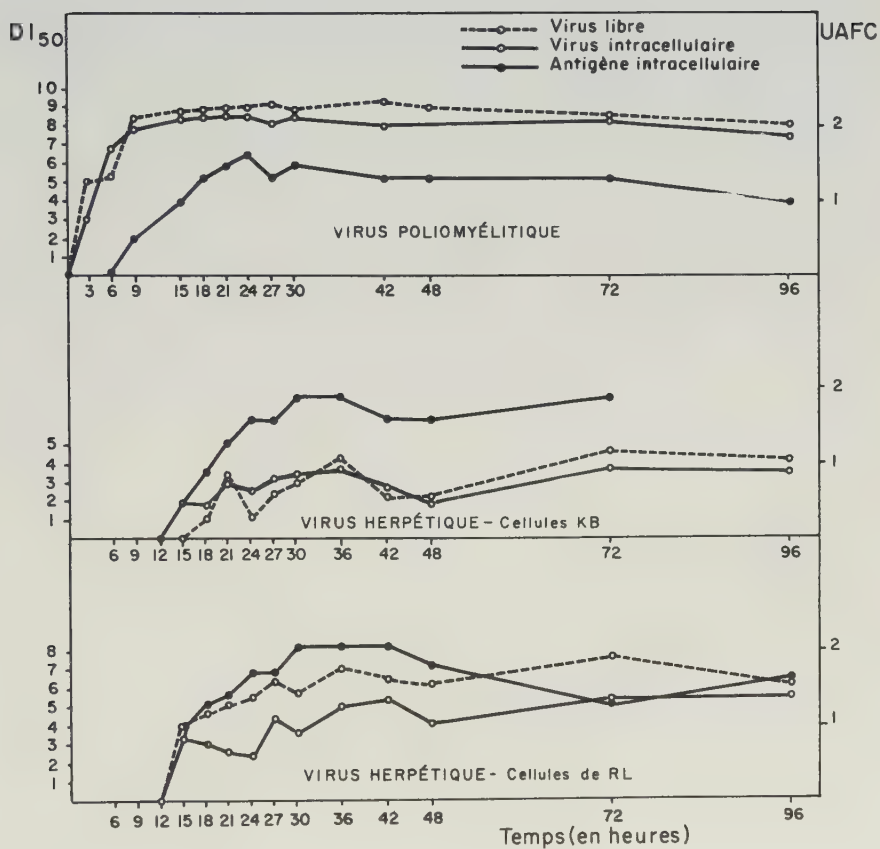


Fig. 18 - Courbes correspondant aux valeurs moyennes du tableau XXL

Schmidt *et al.* (140), dans une étude consacrée à la préparation d'antigène herpétique à partir de fibroblastes d'embryon de poulet insistent sur la nécessité d'associer aux surnageants de culture les débris cellulaires infectés.

D'autre part, l'incubation prolongée à l'étuve, plusieurs jours après la dégénérescence totale du tapis cellulaire, de cultures infectées, entraîne une légère augmentation du titre antigénique des surnageants, comme nous l'avons observé pour le virus herpétique (6), et Maurin *et al.* pour le virus poliomyélitique (104); et ceci s'explique aisément par la libération, par les cellules progressivement lysées, de leur contenu dans le milieu. Signalons, à cette occasion, que, comme Sohier *et al.* (149) et Wildy et Holden (166), nous avons constaté, pour le virus herpétique au cours d'expériences sur oeufs embryonnés, l'augmentation du titre d'antigène fixant le complément des liquides extraembryonnaires à la suite de la mort des embryons, phénomène dont l'explication la plus vraisemblable est aussi l'autolyse des cellules de la membrane chorioallantoïque. Au cours de ces mêmes expériences, nous n'avons jamais pu déceler d'activité antigénique avant l'apparition de virus infectieux, comme c'est le cas pour le virus grippal, ainsi que l'ont montré Hoyle (74), et Henlé et Henlé (67). Ces résultats sont en accord avec ceux de Sosa-Martinez et Lennette (151), et ceux de Wildy et Holden (166); bien que Jawetz *et al.* (81), étudiant la substance sensibilisatrice (responsable de la réaction cutanée de sujets atteints d'herpès, qui fixe aussi le complément), rapportent son apparition 48 heures au moins avant que ne soit titrable le virus infectieux.

Dans ces conditions, nous pensons que l'antigène fixant le complément est un produit intermédiaire dans la synthèse de la particule virale infectieuse complète et entrant dans la constitution de celle-ci, mais dont l'incorporation serait, à des degrés divers (virus poliomyélitique, virus herpétique sur cellules de rein de lapin, virus herpétique sur cellules KB) incomplète. Pour le virus poliomyélitique, le rendement en virus infectieux serait, de loin, le meilleur, et la quantité de matériel antigénique inutilisée la plus faible. Pour le virus herpétique, en particulier sur cellules KB, la cellule serait orientée vers la production d'antigène aux dépens du virus infectieux, cette déviation étant le résultat d'un blocage, à un stade précoce de la synthèse du virus, exercé soit par l'antigène lui-même, soit par une substance inhibitrice de type interféron, mais distincte de celui-ci, produite simultanément. L'apparition d'antigène fixant le complément pourrait alors être considérée comme la conséquence d'un mécanisme de défense de la cellule à l'invasion virale.

L'absence à peu près régulière de pouvoir antigénique des surnageants de culture ne permet pas d'envisager l'antigène fixant le complément comme un produit de dégradation du virus infectieux.

L'inactivation thermique des particules infectieuses libérées dans la phase liquide des cultures, particulièrement importante dans le cas du

virus herpétique, devrait en effet s'accompagner d'une augmentation constante du titre antigénique des surnageants.

Il n'est pas non plus de raison de supposer l'existence d'un seuil dans le nombre des particules virales, exprimé ici par le nombre de DI_{50} , indispensable pour l'apparition de pouvoir antigénique (pour constituer, par exemple, une unité antigénique fixant le complément). En effet, les titres infectieux des surnageants de culture atteignent souvent ou même dépassent ceux des culots cellulaires.

C'est pourquoi nous concluons à la nature dynamique, au niveau des synthèses intracellulaires par exemple, de la relation entre pouvoir antigénique fixant le complément et pouvoir infectieux.

En résumé, de cette étude de l'évolution des pouvoirs infectieux et antigénique des virus herpétique et poliomyélitique en culture cellulaire, nous pouvons conclure que :

- les surnageants de culture, bien qu'infectieux, sont le plus souvent dépourvus de pouvoir antigénique fixant le complément ;
- par contre, ce pouvoir antigénique, donc l'antigène qui en serait le support, est régulièrement retrouvé au cours de la phase intracellulaire du virus ;
- dans ces conditions pouvoir antigénique et pouvoir infectieux ne sont pas assimilables ; mais la relation qui les unit se situe à un stade précoce - intracellulaire - de la synthèse du virus ;
- l'antigène fixant le complément est un produit intermédiaire de cette synthèse, dont la présence en plus ou moins grande quantité peut traduire une altération dans le processus normal de formation de la particule virale infectieuse complète (production simultanée d'une substance inhibitrice ou autointerférence), réaction de la cellule à l'infection virale.

Nous allons voir dans le chapitre suivant dans quelle mesure les renseignements fournis par l'étude physico-chimique de ces antigènes nous ont permis de préciser ces notions.

CHAPITRE IV

ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES PHYSIQUES, CHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES DE LA FRACTION ACTIVE DANS LA FIXATION DU COMPLEMENT

Si pouvoir antigénique et pouvoir infectieux ne sont pas assimilables, comme l'indiquent les résultats de l'étude biologique du chapitre précédent, on doit envisager, à côté de la particule-virus infectieuse, une fraction, distincte de celle-ci et support de tout ou partie de l'activité antigénique. Nous rendons compte ici de l'étude physico-chimique entreprise pour vérifier la validité de cette hypothèse et préciser la nature de la fraction active dans la fixation du complément.

Au premier rang des agents susceptibles d'entraîner une séparation différentielle des deux éléments d'un mélange à la fois antigénique et infectieux, se situe la force centrifuge; aussi est-ce par la description de quelques expériences de centrifugation que nous débuterons cette étude.

I . EXPERIENCES DE CENTRIFUGATION

A - ANTIGENE HERPETIQUE

Nous avons réuni dans ce paragraphe un certain nombre d'expériences pratiquées à des vitesses différentes, sur du matériel de plusieurs origines, oeufs et cultures cellulaires.

1 . ANTIGENES PREPARES SUR MEMBRANES CHORIO ALLANTOIQUES

L'antigène initial T a été obtenu par la technique de Dudgeon (40), décrite au chapitre II. La centrifugation a été exécutée selon le schéma de la figure 19, dans une centrifugeuse refroidie type «International» à 20.000 g

(centrifugation angulaire à 16.250 t/mn). S et C sont respectivement le surnageant et le culot de cette centrifugation. Les titres antigéniques ont été déterminés par microréaction de fixation du complément sur plaque, et les titres infectieux par inoculation sur membrane chorio-allantoïque. Les résultats sont groupés dans le tableau XXII.

On voit qu'à cette vitesse, la plus grande partie de l'activité antigénique reste dans le surnageant, bien que les titres infectieux indiquent la sédimentation d'une partie non négligeable des particules infectieuses.

2 - LIQUIDES ALLANTOIQUES ET AMNIOTIQUES

Un mélange de liquides allantoïques et amniotiques est soumis à une ultracentrifugation à 100.000 g environ (40.000 t/mn, rotor 40 de l'ultracentrifugeuse «préparative Spinco, modèle L»). Le schéma de la centrifugation est indiqué à la figure 20, et les résultats sont donnés dans le tableau XXIII; S et C sont le surnageant et le culot de la centrifugation, la réaction de fixation du complément a été faite sur plaque, et les titres infectieux sont obtenus sur membrane chorio-allantoïque.

Dans ce cas, une forte proportion du virus infectieux est sédimentée (différence de plus de trois log entre les titres du surnageant et du culot). Néanmoins, le surnageant reste antigénique, ce qui laisse soupçonner l'existence, à côté d'un antigène «viral», particulière, d'un antigène «soluble», nous dirons séparable, de taille inférieure à celle de la particule infectieuse, tel qu'en ont décrit pour le virus grippal Hoyle et Fairbrother (75) et Henlé et Wiener (68), et pour le virus ourlien Henlé *et al.* (66).

Hayward (63) fut la première à mettre en évidence en 1949 un tel antigène associé au virus herpétique, et les études de Dudgeon (40), Brown (19), Wildy et Holden (166) confirmèrent ses résultats.

3 - ANTIGENES PREPARES SUR CULTURES CELLULAIRES

Un antigène obtenu à partir de cellules de rein de lapin (contenu intracellulaire, concentré 50 fois selon la technique du chapitre II), et de titre infectieux 6,5 log DI₅₀/ml, subit deux ultracentrifugations successives selon le schéma de la figure 21. T est l'antigène initial, S I et S II la partie supérieure des surnageants des première et deuxième ultracentrifugations, et C le culot de celles-ci, soumis à une dernière centrifugation à faible vitesse, de manière à précipiter les débris accumulés au cours des centrifugations successives. Le tableau XXIV groupe les résultats.

On voit que dans S I on ne récupère qu'une infime partie du pouvoir infectieux, 0,01 %, alors que le titre antigénique n'a baissé que de moitié, et que dans le culot on retrouve la totalité du virus infectieux, accompagné

Fig. 19 Centrifugation de l'antigène herpétique "membranes"
(Tableau XXII)

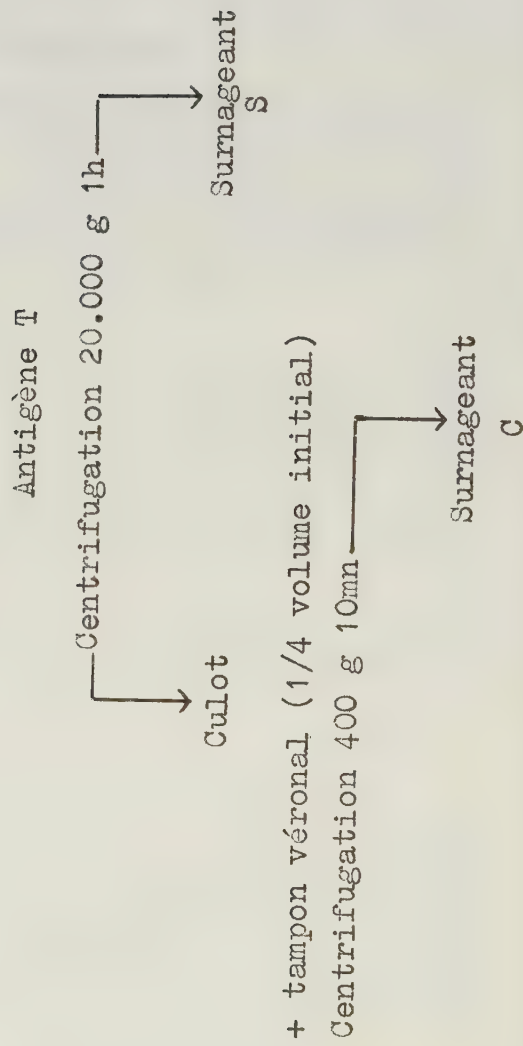


Tableau XXII - Centrifugation d'un antigène herpétique provenant de membranes chorio - allantoïques .

Antigènes		Dilutions du Sérum					Témoins antigènes	Infectiosité
		4	8	16	32	64		
T	1	4	4	4	3	tr.	0	4,8
	2	4	4	4	3	0	0	
	4	4	4	3	tr.	0	0	
	8	4	3	tr.	0	0	0	
S	1	4	4	4	3	0	0	4,3
	2	4	4	4	2	0	0	
	4	4	4	3	0	0	0	
	8	4	3	0	0	0	0	
C	1	4	3	2	tr.	0	0	4,8
	2	3	1	tr.	0	0	0	
	4	1	0	0	0	0	0	
	8	0	0	0	0	0	0	
Mca N 1		0	0	0	0	0	0	-
Diluant		0	0	0	0	0		-

Fixation du complément, par la microméthode sur plaque.

Sérum de lapin immunisé.

T antigène initial.

S surnageant de la centrifugation 1 h à 20 000 g C culot de cette centrifugation.

Infectiosité, log DI 50 / ml

Fig. 20 Ultracentrifugation des liquides allantoïques et amniotiques
herpétiques (Tableau XXIII)

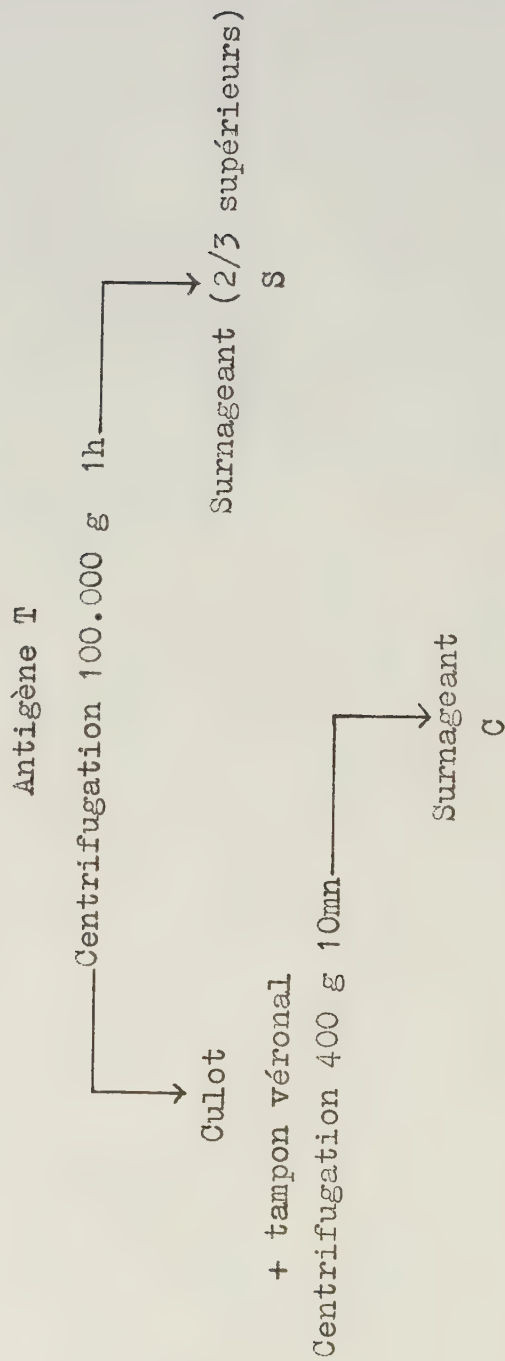


Tableau XXIII - Ultracentrifugation de liquides allantoïques et amniotiques herpétiques.

Antigènes		Dilutions du Sérum					Témoins antigènes	Infectiosité
		4	8	16	32	64		
T	1	4	4	4	3	2	0	5,3
	2	4	4	4	3	0	0	
	4	4	4	3	tr.	0	0	
	8	1	1	0	0	0	0	
S	1	4	4	4	0	0	0	2,5
	2	4	4	3	0	0	0	
	4	2	1	tr.	0	0	0	
	8	0	0	0	0	0	0	
C	1	4	4	4	2	0	0	5,8
	2	4	4	3	1	0	0	
	4	tr.	0	0	0	0	0	
	8	0	0	0	0	0	0	
A A N 1		0	0	0	0	0	0	-
Diluant		0	0	0	0	0		-

Fixation du complément par microméthode sur plaque.

· Sérum de lapin immunisé

T antigène initial

S surnageant de l'ultracentrifugation 1 h à 100 000 g ,

C culot de cette ultracentrifugation .

Infectiosité, log DI₅₀ / ml .

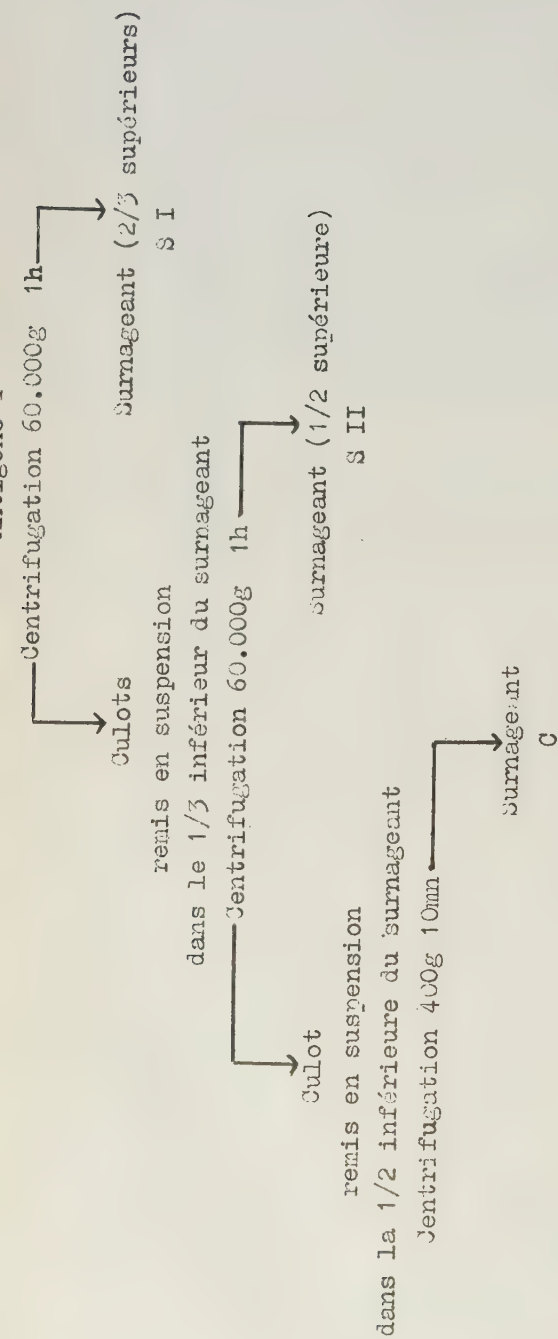


Fig. 21 Ultracentrifugation d'un antigène herpétique d'origine cellulaire
(tableau XXIV)

Tableau XXIV - Ultracentrifugation d'un antigène herpétique préparé sur cellules de rein de lapin : infectiosité.

Antigènes		Dilutions du Sérum					Témoins antigènes	Infectiosité
		8	16	32	64	128		
T	2	4	4	4	4	4	0	6,5
	4	4	4	4	4	4	0	
	8	4	4	4	4	4	0	
	16	4	4	4	3	2	0	
S I	2	4	4	4	4	4	0	2,6
	4	4	4	4	4	4	0	
	8	4	4	4	4	3	0	
	16	4	4	4	1	0	0	
S II	2	4	4	4	4	4	0	3,6
	4	4	4	4	4	4	0	
	8	4	4	4	4	0	0	
	16	4	4	4	tr.	0	0	
C	2	4	4	4	4	4	0	7
	4	4	4	4	4	4	0	
	8	4	4	4	4	4	0	
	16	4	4	4	tr.	0	0	
RL N	1	1	0	0	0	0	0	-
RLNS	1	0	0	0	0	0	0	-
RLNC	1	4	4	1	0	0	0	-
	2	1	0	0	0	0	0	-
Diluant		0	0	0	0	0	0	-

Sérum de lapin immunisé

T antigène initial
S I surnageant de la première ultracentrifugation, S. II surnageant de la seconde.
C culot de ces deux ultracentrifugations successives.
RLNS surnageant } d'une ultracentrifugation, dans les mêmes conditions, de ma-
RLNC culot } tériel cellulaire (rein de lapin) normal.

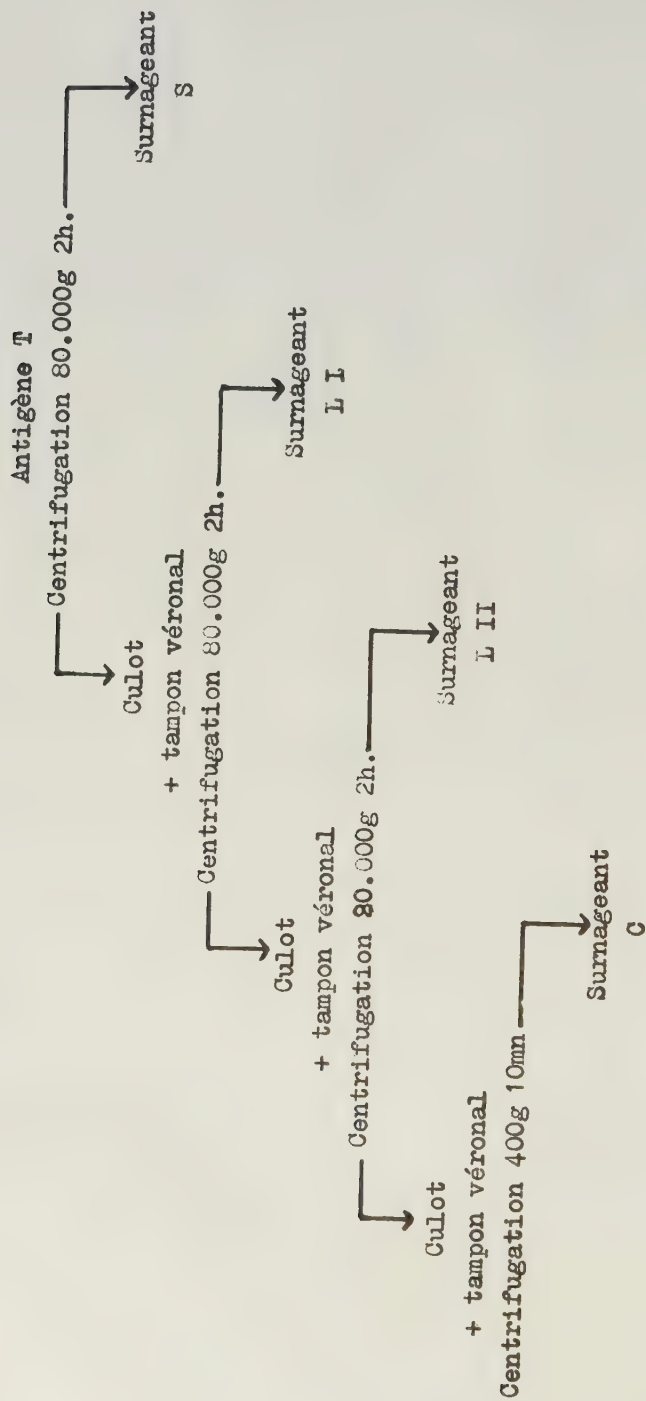


Fig. 22 Ultracentrifugation d'un antigène herpétique d'origine cellulaire
(tableau XXV)

de pouvoir antigénique. Ces résultats confirment donc bien la dualité de l'antigène fixant le complément, séparable des particules-virus d'une part, associé à celles-ci d'autre part (sous la réserve, cependant, qu'ont pu précipiter à cette vitesse, des particules de taille inférieure à celle du virus, mais sous forme d'agrégats); et les conditions nécessaires pour précipiter la plus grande partie du virus infectieux (deux ultracentrifugations à 60.000 g, pour un virus de diamètre moyen 175 μ) ne sont cependant pas suffisantes pour entraîner la disparition de tout pouvoir antigénique du surnageant.

Cette expérience a été complétée par la suivante (figure 22), destinée à exclure la possibilité d'adsorption sur les particules infectieuses, de l'antigène séparable, et introduisant des lavages intermédiaires du culot de centrifugation (temps omis de la précédente expérience, de manière à réduire au maximum les pertes de virus infectieux, dues à la labilité du virus herpétique, et survenant au cours des lavages, du fait, en particulier, de l'élution dans le tampon au véronal, indispensable pour la fixation du complément, par contre peu favorable au maintien de l'infectiosité).

S, le surnageant d'une première ultracentrifugation 2 heures à 80.000 g environ (35.000 t/mn, rotor 40), L I et L II, les surnageants de deux nouvelles ultracentrifugations à la même vitesse, équivalant à deux lavages du culot C, produit final de ces trois ultracentrifugations successives.

On voit au tableau XXV qu'en dépit des lavages, au cours desquels on n'entraîne qu'une très faible partie de l'activité antigénique, et malgré le titre antigénique du premier surnageant, un certain pouvoir antigénique est encore associé au culot de ces ultracentrifugations successives.

A noter, en outre, que le titre du sérum est légèrement supérieur avec la fraction sédimentable des préparations qu'avec l'antigène séparable. Hoyle signale un phénomène analogue à l'occasion d'une étude du virus grippal (73).

Enfin, nous avons répété ces expériences d'ultracentrifugation sur du matériel antigénique non infectieux, soit que le pouvoir infectieux ait spontanément disparu (préparations de titre infectieux très faible, et séjour à + 4°, par exemple), soit qu'il ait été artificiellement supprimé (traitement à l'éther).

L'expérience I a été pratiquée avec un antigène obtenu sur cellules de rein de lapin et soumis à un volume égal d'éther, ce qui, comme nous l'avons vu au chapitre II, laisse intact le pouvoir antigénique. Après élimination de l'éther par évaporation, le matériel est centrifugé selon le schéma de la figure 20. Les résultats du tableau XXVI confirment la réalité de l'antigène séparable. Ils mettent, en outre, en évidence que les particules virales inactivées conservent leur activité antigénique fixant le complément.

On peut donc supposer que celle-ci est associée à une fraction de la particule-virus (antigène de surface, par exemple) qui n'intervient pas dans l'infectiosité du virus. Nous verrons que les résultats de l'ultracentrifugation analytique permettent d'exclure l'hypothèse ou d'une troisième catégorie de particules, de taille intermédiaire entre celle du virus infectieux et celle de l'antigène séparable ou d'amas de particules-support de celui-ci et qui accompagneraient alors le virus dans sa sédimentation.

L'expérience I a été répétée sur un antigène provenant de cellules KB, dont le pouvoir infectieux, très faible à l'origine, s'est spontanément inactivé au cours des manipulations. Le schéma des opérations est le même que celui donné à la figure 22, et les résultats sont groupés dans le tableau XXVII. En raison de l'origine de l'antigène (cellules KB), un sérum humain, et non un sérum de lapin, a été utilisé pour la fixation du complément. On voit que, dans ces conditions, la presque totalité de l'antigène est récupérée dans le culot des trois centrifugations à 80.000 g.

L'examen sur ce même sérum humain, et sur d'autres, prélevés dans les mêmes conditions, d'antigènes préparés sur cellules de rein de lapin, a permis de confirmer ce résultat, et de l'imputer à la qualité du sérum, et non à celle de l'antigène. La présence dans les sérums humains d'anticorps dirigés contre l'antigène séparable n'est en effet pas constante, et il semble que ceci soit en relation avec le temps de prélèvement du sérum; un sérum humain, prélevé très tardivement après une manifestation méningée, nous a en effet fourni les mêmes résultats que les sérums provenant de lapins, saignés, en général, entre la 5^{ème} et la 8^{ème} semaine après le début de l'immunisation. Nos résultats confirment ceux de Balducci *et al.* (8) qui ont signalé les résultats irréguliers obtenus en utilisant des sérums humains pour l'étude du fractionnement d'antigènes herpétiques. Et ces divergences pourraient trouver leur explication dans les travaux de Lippelt et Söltz-Szöts (99, 150) : ces auteurs ont mis en évidence une relation entre l'élévation des anticorps anti-S (contre l'antigène séparable) et une réinfection cutanée chez des animaux en expérience, ou une récurrence chez des sujets atteints d'herpès récurrent, tandis que reste constant le titre d'anticorps anti-V (contre l'antigène viral). Or nos sérums humains furent prélevés, sauf celui mentionné plus haut, chez des malades lors d'une poussée d'herpès cutané, sans doute avant que ne soient apparus ou réapparus les anticorps anti-S, tandis que les sérums de lapins immunisés contenaient à la fois les anticorps anti-S et anti-V de Lippelt et Söltz-Szöts.

Avant d'en terminer avec l'antigène herpétique, nous donnerons ici les résultats d'une ultracentrifugation analytique que nous devons à l'obligeance de M. J. Pelmont, qui l'a pratiquée pour nous sur le modèle E d'une ultracentrifugeuse «Spinco». Elle a été faite sur un antigène préparé sur cellules de rein de lapin, et 500 fois concentré selon la technique adoptée

Tableau XXV. Ultracentrifugation d'un antigène herpétique préparé sur cellules de rein de lapin : lavages du culot.

Antigènes		Dilutions du Sérum					Témoins antigènes
		8	16	32	64	128	
T	4	4	4	4	4	4	0
	8	4	4	4	4	4	0
	16	4	4	4	4	0	0
	32	4	4	4	1	0	0
S	4	4	4	4	0	0	0
	8	4	4	4	0	0	0
	16	4	4	4	0	0	0
	32	4	4	0	0	0	0
L I	1	4	4	4	0	0	0
	2	4	4	3	0	0	0
L II	1	4	4	1	0	0	0
	2	3	tr.	0	0	0	0
C	2	4	4	4	4	0	0
	4	4	4	4	4	0	0
	8	3	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0	0
RL N		0	0	0	0	0	0
Diluant		0	0	0	0	0	0

Sérum de lapin immunisé.

T antigène initial.

S L I, L II surnageants des 1^{ère}, 2^e et 3^e ultracentrifugations respectivement.

C culot de ces 3 ultracentrifugations successives.

**Tableau XXVI - Ultracentrifugation d'antigène herpétique non infectieux :
expérience 1.**

Antigènes		Dilutions du sérum					Témoins antigènes	Infectiosité
		8	16	32	64	128		
T	2	4	4	4	4	2	0	0
	4	4	4	4	4	1	0	
	8	4	4	4	2	0	0	
S	1	4	4	4	4	0	0	0
	2	4	4	4	4	0	0	
	4	4	4	4	4	0	0	
	8	4	4	4	0	0	0	
C	1	4	4	4	4	tr.	0	0
	2	4	4	4	2	0	0	
	4	4	4	4	tr.	0	0	
	8	4	4	tr.	0	0	0	
RL N	1	0	0	0	0	0	0	-
Diluant		0	0	0	0	0	0	-

Sérum de lapin immunisé.

Même schéma d'expérience qu'à la fig. 21.

T antigène initial, traité à l'éther.

S surnageant d'une ultracentrifugation à 25.000 g.

C culot de cette ultracentrifugation.

Tableau XXVII - Ultracentrifugation d'antigène herpétique non infectieux : expérience II.

Antigènes		Dilutions du Sérum					Témoins antigènes	Infectiosité
		8	16	32	64	128		
T	2	4	4	4	2	0	0	1,5
	4	4	4	4	1	0	0	
	8	4	4	4	tr.	0	0	
	16	4	4	4	0	0	0	
S	2	4	0	0	0	0	0	0
	4	4	3	0	0	0	0	
	8	4	1	0	0	0	0	
L I	1	4	3	0	0	0	0	0
	2	4	1	0	0	0	0	
L II	1	4	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	
C	2	4	4	4	1	0	0	0
	4	4	4	4	3	0	0	
	8	4	4	4	4	0	0	
	16	4	4	4	4	0	0	
KBN	1	0	0	0	0	0	0	-
KBNS	1	0	0	0	0	0	0	-
KBNC	1	0	0	0	0	0	0	-

Sérum humain.

Même schéma d'expérience qu'à la fig. 22.

T antigène initial, préparé sur cellules K B.

S, L I, L II surnageants des 1^{ère}, 2^e et 3^e ultracentrifugations respectivement

KBNS surnageant }
KBNC culot } d'une ultracentrifugation du matériel cellulaire normal (K B)

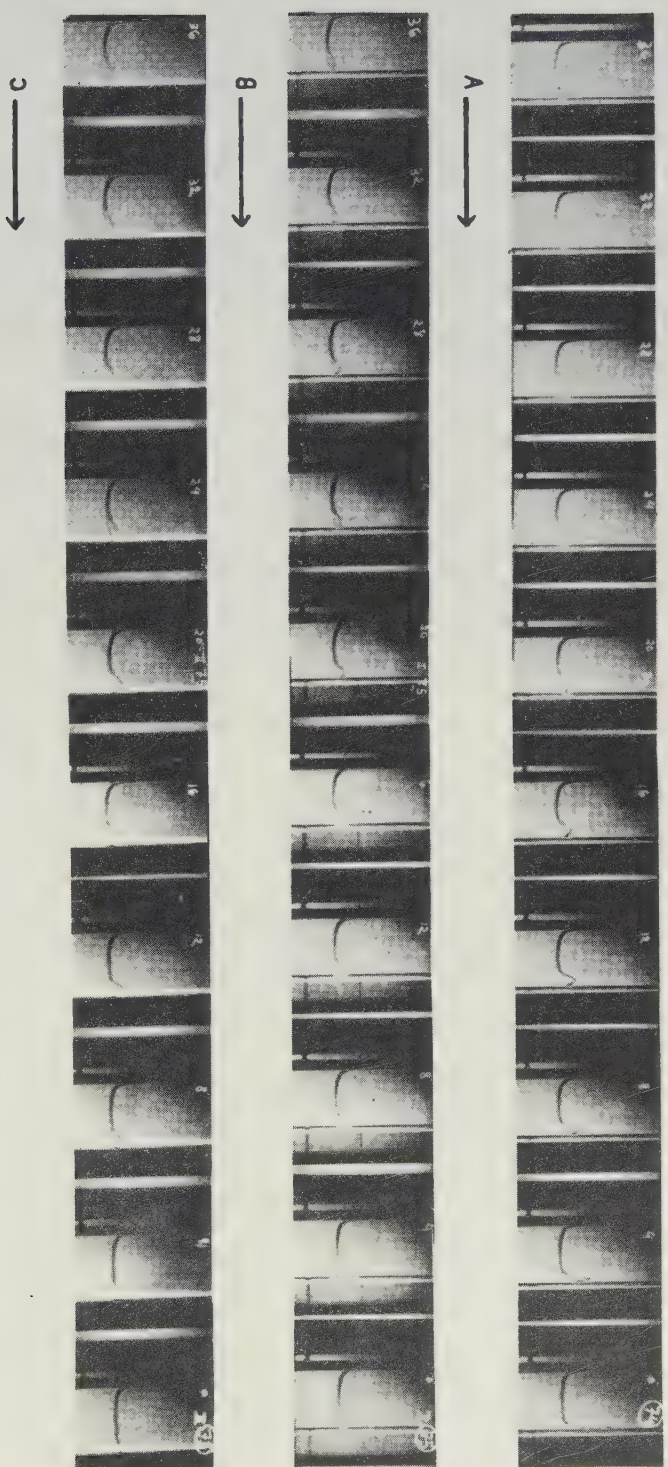


Fig. 23 - Ultracentrifugation analytique de l'antigène herpétique
Evolution entre 0 et 36 mn.

- A. Antigène herpétique et témoin
- B. Antigène normal et diluant
- C. Antigène spécifique et diluant

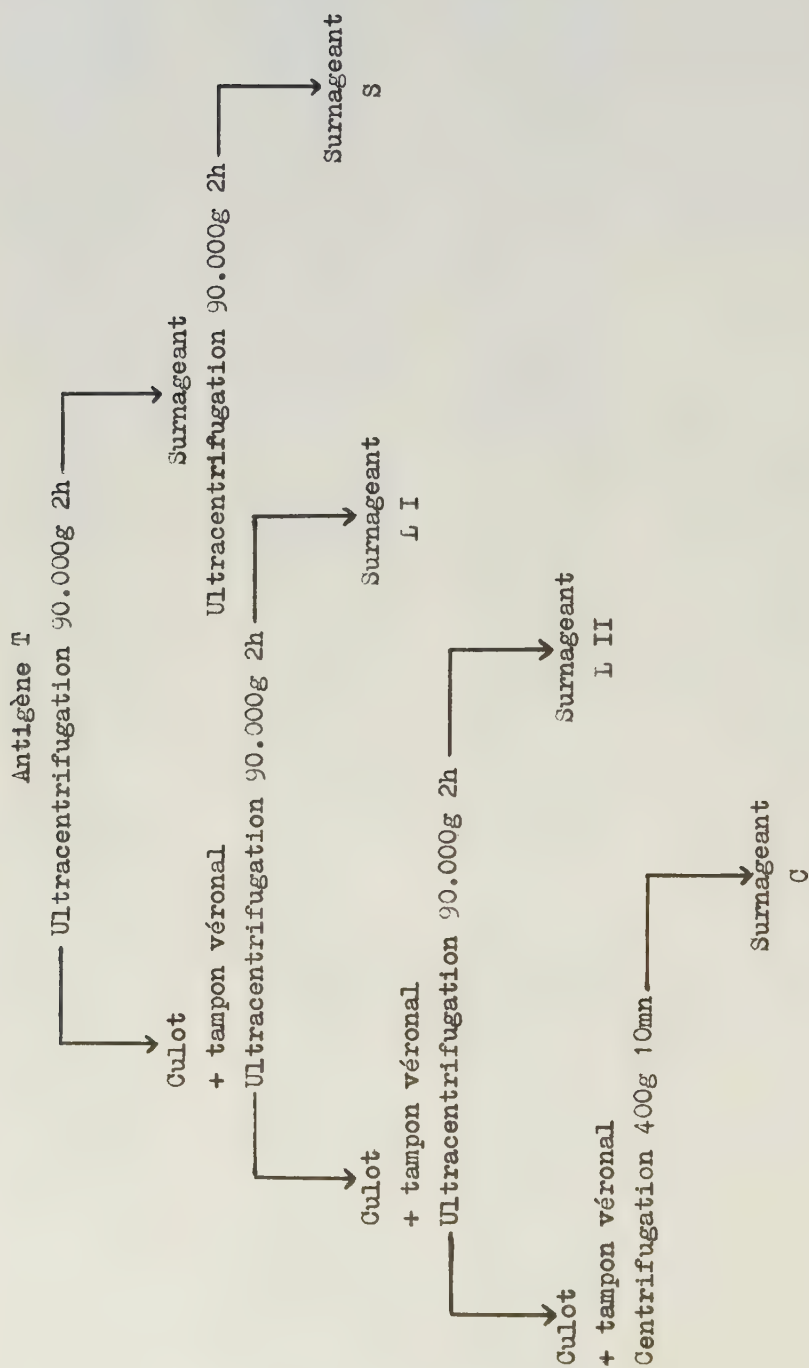


Fig. 24 Ultracentrifugation d'un antigène poliomyélique

Tableau XXVIII - Ultracentrifugation d'un antigène poliomyélitique.

Antigènes	Dilutions du Sérum					Témoins antigènes	Infectiosité
		8	16	32	64	128	
T	2	4	4	4	4	3	8,1
	4	4	4	4	4	2	
	8	4	4	4	4	1	
	16	4	4	2	1	0	
S	2	4	4	1	0	0	3,5
	4	4	3	2	0	0	
	8	3	1	0	0	0	
	16	0	0	0	0	0	
L I	1	4	4	1	0	0	4,5
	2	1	tr.	0	0	0	
L II	1	2	1	tr.	0	0	4,5
	2	0	0	0	0	0	
C	2	4	4	4	4	3	8,5
	4	4	4	4	4	2	
	8	4	4	2	1	0	
	16	3	1	0	0	0	
KBN	1	0	0	0	0	0	-
Diluant		0	0	0	0	0	-

Sérum humain.

T antigène initial.

S, L I, L II, surnageants des 1^{ère}, 2^e et 3^e ultracentrifugations.

C culot de ces ultracentrifugations.

pour le matériel provenant de cultures cellulaires. Il a été préparé dans les mêmes conditions un témoin normal. L'antigène spécifique titrait, par fixation du complément, le 1/16 (160 UAFC par ml), et, dilué au 1/4, le témoin normal ne donnait aucune réaction.

Les clichés de cette ultracentrifugation sont groupés dans la figure 23.

Le matériel antigénique et le matériel normal correspondant ont été, dans une première expérience, centrifugés simultanément dans une cellule à double secteur de 12 mm. Le cliché A de la figure 23 met en évidence l'existence de deux pics - distincts - correspondant à chacun des deux produits centrifugés, et leur évolution au cours de la centrifugation (59.780 t/mn).

Le cliché B donne le résultat de la centrifugation suivante dans laquelle a été opposé au tampon au véronal (diluant de cette expérience) le matériel normal.

Enfin la troisième expérience (cliché C) a été faite avec l'antigène spécifique, centrifugé en parallèle avec le diluant.

La constante de sédimentation de l'antigène spécifique, évaluée par M. J. Pelmont, $S_{20} = 4,25$ (unités Svedberg), très faible, semble indiquer que l'on a affaire à des particules de taille très inférieure à celle du virus (PM n'excédant pas 70.000, pour une forme sphérique, et en l'absence de toute donnée sur la constante de diffusion).

B - ANTIGENE POLIOMYELITIQUE

Un antigène (de type II), obtenu sur cellules KB et concentré 50 fois selon la technique du chapitre II, est soumis à plusieurs ultracentrifugations successives à 92.000 g environ (37.000 t/mn, rotor 40 du modèle L de la centrifugeuse Spinco), avec deux lavages intermédiaires, dans le tampon au véronal, du culot, selon le schéma de la figure 24. Les résultats sont groupés dans le tableau XXVIII (fixation du complément sur un sérum de singe, et titrages infectieux sur cellules KB).

On voit, que contrairement à ce que nous avons constaté pour le virus herpétique, on récupère le pouvoir antigénique à peu près exclusivement dans le culot des ultracentrifugations, où se trouve aussi le pouvoir infectieux (0,001 % seulement de celui-ci subsistant dans le surnageant). On serait donc appelé à conclure à l'existence d'un seul élément, la particule-virus, support des deux activités, antigénique et infectieuse, si l'étude dynamique du chapitre précédent ne nous avait montré que la relation biologique entre ces deux activités n'était pas aussi étroite, et si on ne

mettait parfois en évidence du virus infectieux, sans qu'y soit associé de pouvoir antigénique.

Mais une remarque s'impose ici : les conditions de centrifugation (force centrifuge et durée), nécessaires pour précipiter la plus grande partie des particules de virus poliomyélitique, virus de petite taille (27 m μ), sont telles qu'elles pourraient entraîner la sédimentation des particules distinctes de celui-ci, mais de taille voisine, auxquelles serait lié le pouvoir antigénique. En fait, Mayer *et al.* (106) ont, par ultracentrifugation dans un gradient de concentration, prouvé l'existence, à côté du virus infectieux (composé «D»), d'un composé «C», plus léger que «D», non infectieux et fixant le complément, donc assimilables à un antigène séparable. Les procédés, que nous avons employés pour cette étude, ne nous permettent pas de dire si nos culots d'ultracentrifugation contenaient ou non un mélange de ces deux composés.

Des études de Selzer et van den Ende (146) et de Selzer et Polson (147) indiquent la présence d'un antigène séparable («soluble») dans les préparations de cerveaux de souriceaux infectés. Mais elle peut n'être que la conséquence des traitements subis par celles-ci, les travaux de Rustigian *et al.* (132), Black et Melnick (16), et Roizman *et al.* (129), ayant montré que certains agents, acétone, formol, rayonnement ultra-violet et chaleur entre autres, pouvaient provoquer l'apparition d'un antigène séparable ou du composé «C» dans des préparations qui en étaient à l'origine dépourvues.

Nous n'avons pu, faute de matériel suffisamment concentré, réaliser, avec l'antigène poliomyélitique, une ultracentrifugation analytique, comme pour l'antigène herpétique.

II - ACTION DE LA TEMPERATURE

Nous avons déjà dit (chapitre II, § IV «Conservation des antigènes») que nos antigènes, herpétique ou poliomyélitique, étaient stables à + 4° (pendant un minimum de trois mois), ce qui, en ce qui concerne le virus herpétique tout au moins, est un élément intéressant pour la comparaison des pouvoirs infectieux et antigénique de ce virus, quand on connaît sa labilité (95).

Par séjour 30 mn au bain-marie à 37°, on n'observe aucune baisse de titre ni de l'antigène herpétique, ni de l'antigène poliomyélitique, résultat aisément prévisible, étant donné les conditions de culture adoptées pour l'obtention de ces antigènes.

Le tableau XXIX donne un exemple de résultats d'expériences pratiquées à des températures supérieures, tant pour l'antigène herpétique

Tableau XXIX - Action de la chaleur sur les antigènes herpétique et poliomyélitique

Antigènes			Dilutions des Sérums					Témoins antigènes
			8	16	32	64	128	
Antigène herpétique	T	2	4	4	4	4	1	0
		4	4	4	4	4	0	0
		8	4	4	4	4	0	0
	C 60	2	4	4	3	2	0	0
		4	4	3	2	1	0	0
	C 100	2	4	2	tr.	0	0	0
		4	3	tr.	0	0	0	0
Antigène poliomyélitique	T	2	4	4	4	4	0	0
		4	4	4	4	4	0	0
		8	4	4	4	3	0	0
	C 60	2	4	4	4	4	0	0
		4	4	4	4	4	0	0
		8	4	4	4	3	0	0
	C 100	2	4	4	3	0	0	0
		4	4	4	2	0	0	0
		8	2	1	0	0	0	0

T antigène initial.
 C 60 après chauffage au bain-marie à 60°.
 C 100 après chauffage au bain-marie à 100°.

(d'origine oeufs ou cultures cellulaires), que pour l'antigène poliomyélitique.

On voit que dans le cas de l'antigène herpétique, l'activité baisse dans une proportion importante par séjour 30 mn au bain-marie à 60°, alors qu'elle reste intacte pour l'antigène poliomyélitique.

Mais ni l'un ni l'autre ne résistent à l'ébullition 30 mn au bain-marie

III - ACTION DE L'ETHER

Nous avons déjà mentionné au chapitre II que l'action de l'éther (1 à 3 heures) ne modifiait aucunement l'activité antigénique de préparations herpétiques ou poliomyélitiques (procédé utilisé pour supprimer certaines réactions aspécifiques entre sérums de lapins immunisés et antigènes d'origine KB).

Nous insisterons ici sur un point particulièrement important concernant le pouvoir antigénique et le pouvoir infectieux du virus herpétique : si l'activité antigénique résiste à l'éther, par contre la plus grande partie du pouvoir infectieux a disparu après contact d'une suspension virulente avec un volume égal d'éther refroidi, fraîchement distillé, donc dépourvu de peroxydes. Ceci est en accord avec les résultats de Kaplan (83). Et comme ce dernier, nous avons pu constater la sensibilité du virus herpétique au fréon, utilisé par Gessler *et al.* (52) pour la purification de certains virus : l'homogénéisation deux fois 30 secondes, dans un appareil tournant à grande vitesse, d'une préparation virulente en présence de fréon, a entraîné une baisse du titre infectieux supérieure à 3 log.

Cette différence de sensibilité des pouvoirs infectieux et antigénique du virus herpétique est un argument supplémentaire en faveur de l'existence de deux fractions, support de ces activités, et contre l'hypothèse de l'antigène fixant le complément, considéré comme produit de dégradation du virus : en effet, le traitement par l'éther de matériel infectieux et non antigénique n'entraîne pas l'apparition de pouvoir antigénique, ni la modification du titre antigénique d'un produit à l'origine à la fois infectieux et antigénique.

On peut conclure à la présence, dans la composition du virus herpétique, de lipides, qui n'interviendraient pas dans l'activité antigénique.

Quant au virus poliomyélitique, il est, comme tous les virus du groupe des entérovirus, résistant à l'éther.

IV - ACTION DU pH SUR LA STABILITE DE L'ACTIVITE ANTIGENIQUE

L'expérience que nous allons décrire, destinée à établir la stabilité de nos antigènes à différents pH, a été pratiquée en parallèle :

- d'une part, sur un antigène herpétique préparé sur cellules de rein de lapin (500 fois concentré);
- d'autre part, sur un antigène poliomyélitique (type II, MEF 1) provenant de cellules KB (500 fois concentré).

Les pH de 3 à 10 (une expérience préliminaire à pH 2 nous ayant permis de constater la dénaturation à ce pH des deux catégories d'antigène) ont été essayés et obtenus par addition à un volume constant de solution de Britton et Robinson (pour 1 l d'eau distillée : 3,92 g d'acide orthophosphorique; 2,40 g d'acide acétique glacial; 2,48 g d'acide borique) de volumes variables de soude N/5.

Des volumes donnés (3 ml) de chacun des antigènes ont été dialysés pendant 72 heures contre les solutions de pH 3 à 10, qui ont été ensuite remplacées par le tampon au véronal (105), dans lequel la dialyse a été poursuivie jusqu'à obtention du pH 7,2.

Les antigènes prélevés ont alors été centrifugés s'il y avait lieu (abondant précipité apparu, à la mise en dialyse, aux pH 3 à 6 inclus, et qu'il a été impossible de redissoudre dans une solution neutre, mais qui ont été néanmoins essayés par fixation du complément en même temps que les surnageants), et leur activité antigénique a été contrôlée par réaction de fixation du complément.

Les résultats ont été quelque peu différents pour l'antigène herpétique d'une part, et poliomyélitique d'autre part.

A - ANTIGENE HERPETIQUE

- à pH 3, plus d'activité antigénique, ni dans le surnageant, ni dans le précipité.

- aux pH 4 et 5, on récupère une très faible activité dans le précipité (décelable en dépit du pouvoir anticomplémentaire).

- à pH 6, malgré la présence d'activité dans le précipité, la plus grande partie de l'antigène est retrouvée dans le surnageant.

- enfin, l'activité antigénique est stable du pH 7 au pH 10, auxquels le titre de l'antigène est le même que dans la préparation initiale.

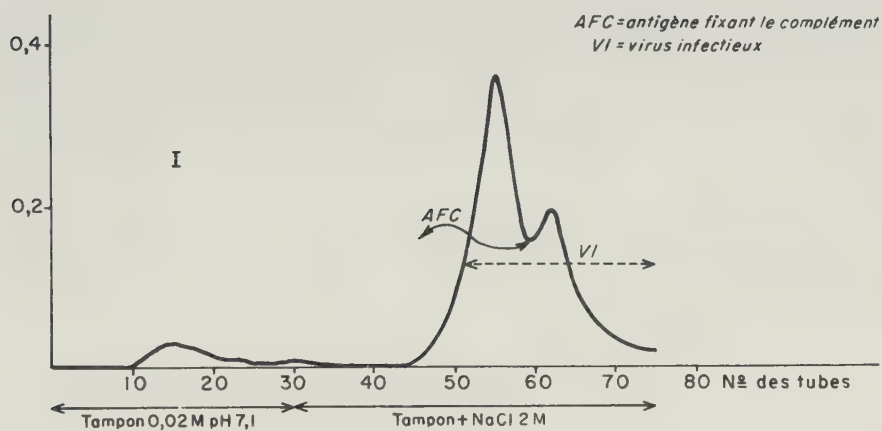
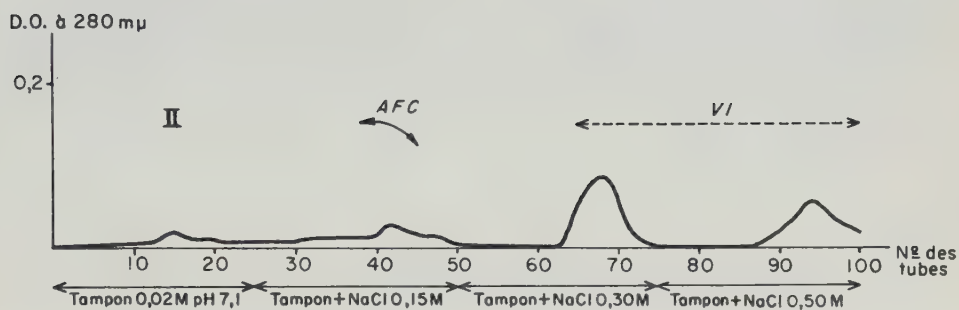


Fig. 25 - Séparation chromatographique de l'activité antigénique et du pouvoir infectieux du virus herpétique.

B ANTIGENE POLIOMYELITIQUE

Le pouvoir anticomplémentaire des précipités provoqués par la dialyse aux pH 3 à 6 et remis en suspension dans le tampon au véronal, est trop considérable pour permettre une conclusion concernant l'activité antigénique résiduelle qu'ils pourraient contenir, (précipitation du matériel étranger provenant des cellules KB, support de la culture du virus).

Mais on peut constater par examen des sumageants, obtenus par la dialyse aux pH 3 à 5 et 10, que la moitié environ de l'activité antigénique est retrouvée dans les sumageants des antigènes soumis à ces pH.

Entre les pH 6 à 9, on récupère la totalité de l'activité antigénique.

En conclusion, les pH alcalins semblent donc être plus favorables à l'*antigène herpétique* que les pH acides, l'activité étant totalement détruite entre les pH 2 et 6. Signalons à cette occasion que dans une étude récente (122), consacrée à l'inactivation par le formol du pouvoir infectieux du virus herpétique subsistant dans des antigènes préparés sur oeufs, Polley souligne la nécessité d'agir à pH 8,5, pour sauvegarder la plus grande partie de l'activité antigénique, détruite par contre à pH 6. D'autre part, Munk et Ackermann (109) et Farnham et Newton (46) indiquent aussi la plus grande stabilité du virus lui-même en pH alcalin.

D'autre part, l'activité antigénique du *virus poliomyélitique* s'est révélée plus stable, puisqu'elle est entièrement conservée entre les pH 6 à 9, et qu'en deçà et au-delà, même à pH 3, le titre ne baisse que de moitié.

V - ETUDES CHROMATOGRAPHIQUES

Ces études ont été entreprises en vue

- 1.- de séparer éventuellement activité antigénique et pouvoir infectieux.
- 2.- de purifier dans le même temps la fraction active dans la fixation du complément pour une étude chimique ultérieure.

Nous avons opéré selon la méthode mise au point par Delsal *et al.* (39), et appliquée par ces auteurs à l'étude du «spectre chromatographique des virus poliomyélitiques». La chromatographie des préparations antigéniques est pratiquée sur colonne de diéthylaminoéthyl cellulose (DEAE), préparée selon la méthode de Peterson et Sober (117).

Les antigènes, 500 fois concentrés, préparés sur cultures cellulaires (cellules de rein de lapin pour l'antigène herpétique, technique décrite

chapitre II, § II, 7; cellules KB pour l'antigène poliomyélitique, cf. chapitre II, § III, 3) sont adsorbés (5 ml, dialysés au préalable pendant 24 heures contre du tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1) (*) sur une colonne de 7 g de cellulose. Ce temps est suivi de l'élution, pratiquée avec du tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1, puis avec un gradient de concentration en chlorure de sodium 2 M dans ce même tampon phosphaté, ou avec des solutions de chlorure de sodium de concentrations variables dans le tampon. La densité optique de chacune des fractions éluées est mesurée à 280 μ (spectrophotomètre Beckman), et leurs titres antigénique et infectieux déterminés, d'une part par fixation du complément, d'autre part sur cultures cellulaires (cellules de rein de lapin ou cellules KB).

Tandis que pour les antigènes poliomyélitiques, nous avons procédé à la température du laboratoire, les chromatographies d'antigènes herpétiques ont eu lieu à + 4°, deux expériences préliminaires ne nous ayant pas permis de retrouver de pouvoir infectieux dans les fractions éluées, probablement en raison de l'inactivation thermique du virus.

A - ANTIGENE HERPETIQUE

La souche de virus utilisée a été la souche «59.3055».

Nous donnerons les résultats de deux seulement des dix expériences réalisées au cours de cette étude. Ils sont traduits par les courbes I et II de la figure 25.

Comme on peut le voir sur cette figure, l'élution a été faite, pour l'expérience I,

- avec du tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1 (30 fractions de 5 ml),
- puis avec un gradient de concentration en chlorure de sodium 2 M (100 ml) dans le tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1 (100 ml) (45 fractions de 5 ml).

Cinq fractions (46 à 50) étant douées de pouvoir antigénique, mais dépourvues de pouvoir infectieux, nous avons essayé de séparer pouvoir antigénique et pouvoir infectieux, en agissant sur la concentration saline du tampon d'élution.

La séparation a été effective, comme on peut le constater sur la courbe II de la figure 25, et a été réalisée dans les conditions d'élution suivantes :

- tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1 (25 fractions de 5 ml).

(*) Na_2HPO_4 0,2 M 335 ml
 NaH_2PO_4 0,2 M 165 ml
 eau distillée 4500 ml

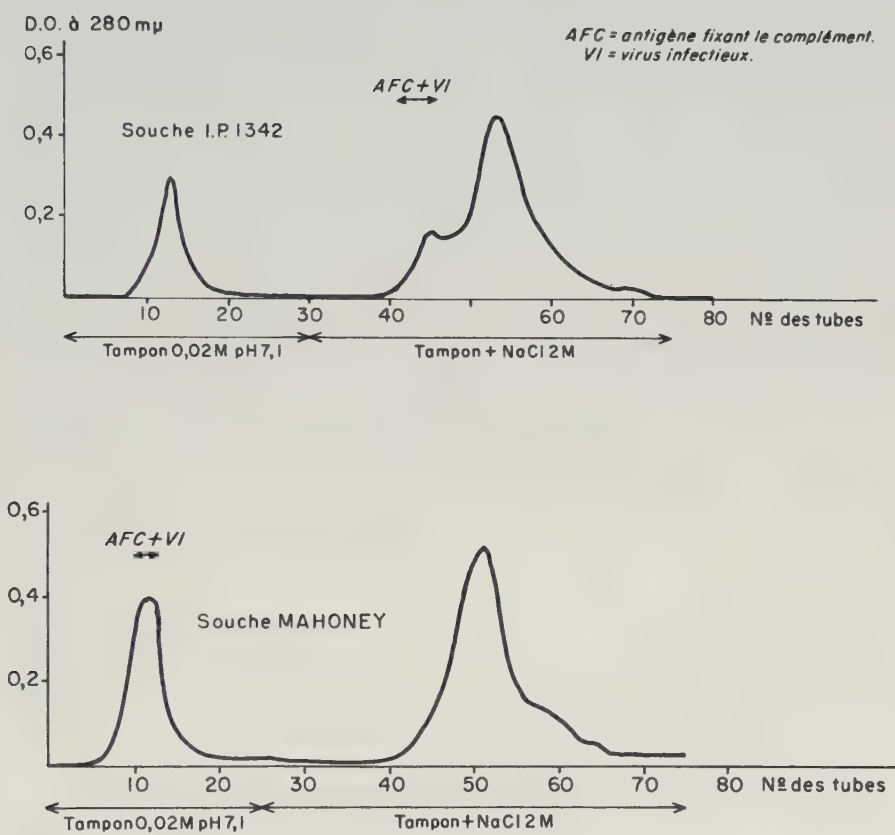


Fig. 26 - Impossibilité de séparation chromatographique de l'activité antigénique et du pouvoir infectieux du virus poliomyélique.

- tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1 + NaCl 0,15 M (25 fractions de 5 ml).
- tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1 + NaCl 0,30 M (25 fractions de 5 ml).
- tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1 + NaCl 0,50 M (25 fractions de 5 ml).

Dans ces conditions, l'élution de l'antigène est sélective à la concentration 0,15 M de chlorure de sodium (on récupère en six fractions la totalité du pouvoir antigénique présent dans la préparation initiale), tandis que le virus infectieux n'apparaît que dans les fractions d'élution correspondant à une concentration supérieure à 0,30 M et continue à s'éluer jusqu'à la fin de l'expérience.

A notre connaissance, la seule tentative de chromatographie du virus herpétique est celle de Taverne et Wildy (158), pratiquée sur colonne de phosphate de calcium. La nature différente de l'adsorbant rend difficile la comparaison des résultats obtenus, de même que l'origine différente des antigènes (liquides amniotiques infectés, l'élution de l'activité antigénique des préparations virulentes sur cellules HeLa n'étant pas rapportée). Cependant, ces auteurs signalent l'élution à deux concentrations différentes en tampon phosphaté de l'activité fixant le complément (0,2 M) qui apparaît là aussi en premier lieu, et ensuite du pouvoir infectieux (0,4 et 0,8 M).

B - ANTIGENE POLIOMYELITIQUE

Plusieurs expériences préliminaires, pratiquées avec un antigène de type II (souche MEF 1) nous ont montré que l'activité antigénique se retrouvait dans les mêmes fractions que le pouvoir infectieux [dans le cas particulier de cette souche, au début du gradient de concentration saline, comme l'ont montré Delsal *et al.* (39)].

Aussi avons-nous essayé de confirmer ce résultat en utilisant pour la préparation des antigènes fixant le complément des souches de virus connues pour leurs propriétés chromatographiques distinctes, mises en évidence par ces mêmes auteurs (39). C'est ainsi que nous avons choisi les deux souches de type I,

- Mahoney, dite virulente en fonction de ses propriétés chromatographiques (élution par le tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1) et
- I P-1342, dite atténuée (élution en présence d'une faible concentration en chlorure de sodium, début du passage du gradient de concentration).

Les courbes correspondant à la chromatographie des antigènes préparés avec chacune de ces souches sont réunies dans la figure 26 :

- pour la souche Mahoney, l'activité antigénique est retrouvée dans les fractions dans lesquelles près de la totalité du pouvoir infectieux est récupérée, fraction correspondant à l'élution du matériel adsorbé par le tampon phosphaté seul.

- pour la souche I P 1342, ce n'est qu'au début du passage du gradient de concentration en chlorure de sodium que s'élue le virus infectieux (97 %) ; c'est là aussi qu'est mise en évidence l'activité antigénique.

En conclusion, la chromatographie s'est révélée, dans le cas du virus herpétique, un procédé efficace de séparation de l'antigène fixant le complément et du virus infectieux. Ces expériences confirment l'existence, à côté de la particule infectieuse, d'une particule de propriétés, de surface tout au moins, différentes, ce qui est en accord avec les conclusions, d'une part de l'étude du chapitre III concernant leur formation, d'autre part des expériences d'ultracentrifugation : nous avons vu, en effet, qu'aux vitesses permettant de centrifuger la plus grande partie du virus infectieux (plus de 99 %, cf. tableau XXIV), subsiste toujours une certaine activité antigénique dans le surnageant, attribuée à un antigène séparable.

Par contre, la chromatographie ne nous a pas permis, pour le virus poliomyélitique, de dissocier les deux activités, antigénique et infectieuse ; ce qui, du reste, confirme, ici aussi, les résultats de l'ultracentrifugation. Les particules qui supportent ces deux activités sont donc ou identiques ou de propriétés de surface très voisines, puisqu'il ne nous a pas été possible de réaliser leur séparation différentielle, en fonction de leur capacité d'adsorption.

VI - ACTION DU SULFATE D'AMMONIUM

Cette étude a été limitée à l'antigène herpétique, préparé sur cellules de rein de lapin. En effet, étant donné la composition chimique très complexe des cellules KB, nous n'avons pu obtenir de résultats satisfaisants, en appliquant la même technique aux antigènes poliomyélitiques provenant de ces cellules : pouvoir anticomplémentaire et courbes d'absorption dans l'ultraviolet indiquaient la précipitation par cet agent de nombreuses impuretés qui masquaient la fraction active.

Nous ne donnerons ici que les résultats d'expériences pratiquées sur des antigènes dépourvus de pouvoir infectieux (inactivation spontanée ou traitement à l'éther), préparés sur membranes chorio-allantoïques ou sur cellules de rein de lapin.

L'antigène est laissé au contact 24 heures à + 4° d'un volume égal d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Le léger précipité apparu est centrifugé, élué dans le tampon au véronal, et mis en dialyse contre celui-ci, ainsi qu'une partie du surnageant d'action du sulfate d'ammonium. Le liquide de dialyse est renouvelé plusieurs fois pendant les 24 premières heures, puis deux fois par jour au cours des jours suivants. La dialyse est

- tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1 + NaCl 0,15 M (25 fractions de 5 ml).
- tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1 + NaCl 0,30 M (25 fractions de 5 ml).
- tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1 + NaCl 0,50 M (25 fractions de 5 ml).

Dans ces conditions, l'élution de l'antigène est sélective à la concentration 0,15 M de chlorure de sodium (on récupère en six fractions la totalité du pouvoir antigénique présent dans la préparation initiale), tandis que le virus infectieux n'apparaît que dans les fractions d'élution correspondant à une concentration supérieure à 0,30 M et continue à s'éluer jusqu'à la fin de l'expérience.

A notre connaissance, la seule tentative de chromatographie du virus herpétique est celle de Taverne et Wildy (158), pratiquée sur colonne de phosphate de calcium. La nature différente de l'adsorbant rend difficile la comparaison des résultats obtenus, de même que l'origine différente des antigènes (liquides amniotiques infectés, l'élution de l'activité antigénique des préparations virulentes sur cellules HeLa n'étant pas rapportée). Cependant, ces auteurs signalent l'élution à deux concentrations différentes en tampon phosphaté de l'activité fixant le complément (0,2 M) qui apparaît là aussi en premier lieu, et ensuite du pouvoir infectieux (0,4 et 0,8 M).

B - ANTIGENE POLIOMYELITIQUE

Plusieurs expériences préliminaires, pratiquées avec un antigène de type II (souche MEF 1) nous ont montré que l'activité antigénique se retrouvait dans les mêmes fractions que le pouvoir infectieux [dans le cas particulier de cette souche, au début du gradient de concentration saline, comme l'ont montré Delsal *et al.* (39)].

Aussi avons-nous essayé de confirmer ce résultat en utilisant pour la préparation des antigènes fixant le complément des souches de virus connues pour leurs propriétés chromatographiques distinctes, mises en évidence par ces mêmes auteurs (39). C'est ainsi que nous avons choisi les deux souches de type I,

- Mahoney, dite virulente en fonction de ses propriétés chromatographiques (élution par le tampon phosphaté 0,02 M pH 7,1) et
- I P-1342, dite atténuée (élution en présence d'une faible concentration en chlorure de sodium, début du passage du gradient de concentration).

Les courbes correspondant à la chromatographie des antigènes préparés avec chacune de ces souches sont réunies dans la figure 26 :

- pour la souche Mahoney, l'activité antigénique est retrouvée dans les fractions dans lesquelles près de la totalité du pouvoir infectieux est récupérée, fraction correspondant à l'élution du matériel adsorbé par le tampon phosphaté seul.

pour la souche I P 1342, ce n'est qu'au début du passage du gradient de concentration en chlorure de sodium que s'élue le virus infectieux (97 %) ; c'est là aussi qu'est mise en évidence l'activité antigénique.

En conclusion, la chromatographie s'est révélée, dans le cas du virus herpétique, un procédé efficace de séparation de l'antigène fixant le complément et du virus infectieux. Ces expériences confirment l'existence, à côté de la particule infectieuse, d'une particule de propriétés, de surface tout au moins, différentes, ce qui est en accord avec les conclusions, d'une part de l'étude du chapitre III concernant leur formation, d'autre part des expériences d'ultracentrifugation : nous avons vu, en effet, qu'aux vitesses permettant de centrifuger la plus grande partie du virus infectieux (plus de 99 %, cf. tableau XXIV), subsiste toujours une certaine activité antigénique dans le surnageant, attribuée à un antigène séparable.

Par contre, la chromatographie ne nous a pas permis, pour le virus poliomyélitique, de dissocier les deux activités, antigénique et infectieuse ; ce qui, du reste, confirme, ici aussi, les résultats de l'ultracentrifugation. Les particules qui supportent ces deux activités sont donc ou identiques ou de propriétés de surface très voisines, puisqu'il ne nous a pas été possible de réaliser leur séparation différentielle, en fonction de leur capacité d'adsorption.

VI - ACTION DU SULFATE D'AMMONIUM

Cette étude a été limitée à l'antigène herpétique, préparé sur cellules de rein de lapin. En effet, étant donné la composition chimique très complexe des cellules KB, nous n'avons pu obtenir de résultats satisfaisants, en appliquant la même technique aux antigènes poliomyélitiques provenant de ces cellules : pouvoir anticomplémentaire et courbes d'absorption dans l'ultraviolet indiquaient la précipitation par cet agent de nombreuses impuretés qui masquaient la fraction active.

Nous ne donnerons ici que les résultats d'expériences pratiquées sur des antigènes dépourvus de pouvoir infectieux (inactivation spontanée ou traitement à l'éther), préparés sur membranes chorio-allantoïques ou sur cellules de rein de lapin.

L'antigène est laissé au contact 24 heures à + 4° d'un volume égal d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Le léger précipité apparu est centrifugé, élué dans le tampon au véronal, et mis en dialyse contre celui-ci, ainsi qu'une partie du surnageant d'action du sulfate d'ammonium. Le liquide de dialyse est renouvelé plusieurs fois pendant les 24 premières heures, puis deux fois par jour au cours des jours suivants. La dialyse est

Tableau XXX - Précipitation de l'antigène herpétique par le sulfate d'ammonium.

Antigènes		Dilutions du Sérum					Témoins antigènes
		8	16	32	64	128	
I	1	4	4	4	0	0	0
	2	4	4	4	0	0	0
	4	3	1	0	0	0	0
I C	1	4	4	4	3	0	0
	2	4	4	4	2	0	0
	4	4	4	3	tr.	0	0
Mca N	1	0	0	0	0	0	0
Mca NC	1	0	0	0	0	0	0
II	2	4	4	4	4	4	0
	4	4	4	4	4	4	0
	8	4	4	4	3	0	0
II C	2	4	4	4	4	4	0
	4	4	4	4	4	3	0
	8	4	4	4	3	0	0
RLN	1	0	0	0	0	0	0
RLNC	1	0	0	0	0	0	0
Diluant		0	0	0	0	0	0

- I antigène provenant de membranes-chorioallantoïques (Mca).
 IC résultat de l'action du sulfate d'ammonium à demi-saturation.
 McaNC culot obtenu dans les mêmes conditions, mais à partir de membranes chorio-
 allantoïques normales.
 II antigène préparé sur cellules de rein de lapin.
 II C obtenu par précipitation par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.
 RLNC à partir du matériel cellulaire normal.

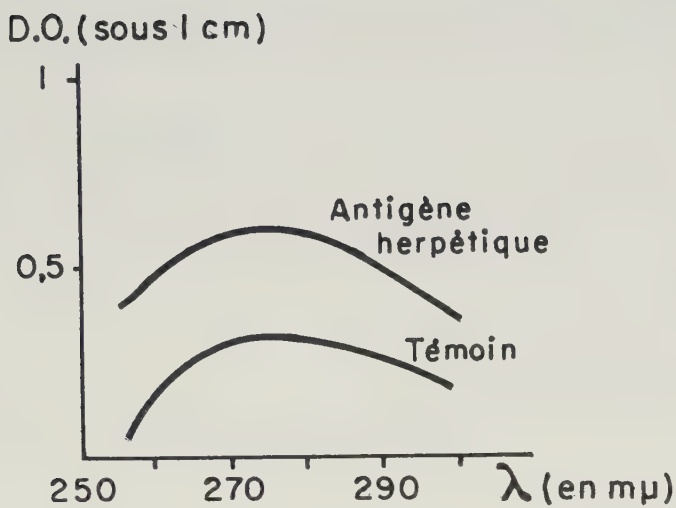


Fig. 27 - Courbe d'absorption dans l'ultraviolet d'un antigène herpétique (préparé sur cellules de rein de lapin) et de son témoin normal (cellules de rein de lapin normales).

interrompue lorsque l'addition au liquide de dialyse de réactif de Nessler ne met plus en évidence la présence d'ions ammonium. Le culot et le surnageant d'action du sulfate d'ammonium sont alors essayés par fixation du complément. On traite en parallèle un témoin normal (membranes chorio-allantoïques normales, cellules de rein de lapin normales).

Après un temps d'action de 24 heures, on ne retrouve pas d'activité antigénique dans le surnageant d'action du sulfate d'ammonium. Cependant, comme on le voit au tableau XXX, la précipitation n'est pas quantitative : l'antigène I a été élué dans un volume de véronal 40 fois moindre que le volume initial, la concentration n'est pas effective, et pour l'antigène II, on ne récupère que la moitié environ de l'activité antigénique. Mais, à de si faibles concentrations de matériel actif, un effet de dilution pourrait expliquer ces mauvais résultats.

D'autre part, on n'observe pas de réaction entre le culot d'action du sulfate d'ammonium sur le matériel normal et un sérum herpétique. La précipitation est donc spécifique.

La figure 27 donne les spectres d'absorption (spectrophotomètre Beckman) d'un antigène préparé sur cellules de rein de lapin et de son témoin normal, après précipitation au sulfate d'ammonium (l'abondance de protéines étrangères dans le matériel obtenu à partir des membranes chorio-allantoïques d'oeufs ne nous a pas permis d'obtenir des courbes significatives). Ces deux spectres ont la même allure générale ; ils semblent pourtant indiquer une précipitation sélective – dans une certaine mesure – de l'antigène spécifique, la densité optique indiquant une concentration supérieure de celui-ci, bien que la teneur initiale en protéines totales eût été supérieure dans le produit normal, préparé à partir de cellules intactes. Enfin, l'absorption sélective à $280\text{ m}\mu$ est en faveur d'une nature protéique de l'antigène fixant le complément.

VII - ACTION DE CERTAINES PROTEASES ET NUCLEASES

1 - TRYPSINE

On ajoute à un volume donné d'antigènes herpétique et poliomyélitique de titres connus une solution de trypsine cristallisée, de manière à obtenir une concentration finale de $100\text{ }\mu\text{g/ml}$. L'incubation au bain-marie à 37° 30 minutes est suivie de l'addition d'inhibiteur de trypsine («Soybean trypsin inhibitor»).

L'examen dans un même temps par réaction de fixation du complément – d'antigènes laissés 30 mn à 37° en l'absence de trypsine,
– des antigènes incubés en présence de trypsine.

- d'une solution à 100 $\mu\text{g/ml}$ de trypsine, permet de constater que :
 - le séjour au bain-marie à 37° n'a aucune influence sur le titre des antigènes herpétique ou poliomyélitique, cf. § II,
 - la solution de trypsine à 100 $\mu\text{g/ml}$ a un fort pouvoir anti-complémentaire, qui interdit toute conclusion concernant son action sur les antigènes étudiés.

L'expérience, répétée avec un autre lot de trypsine cristallisée, a conduit aux mêmes résultats.

2 - PEPSINE

En raison de la dénaturation de nos antigènes à pH 2, nous avons essayé de faire agir la pepsine à un pH beaucoup moins acide, mais en prolongeant son temps d'action.

Des volumes donnés d'antigènes herpétique et poliomyélitique sont dialysés contre un tampon à pH 5,8 (solution de Britton et Robinson, additionnée de soude N/5) pendant un temps suffisant pour les amener à ce pH.

Ces antigènes sont alors soumis à l'action d'une pepsine purifiée (concentration finale 100 $\mu\text{g/ml}$) au bain-marie à 37°, pendant 1, 2 et 3 heures. Cette action est interrompue par la dialyse contre le tampon au véronal pH 7,2 (105), et les différents échantillons sont ensuite examinés par fixation du complément. A la même réaction sont joints les témoins de l'action de la dialyse et de la température (antigènes dialysés à pH 5,8, laissés 1, 2 et 3 heures au bain-marie sans pepsine et redialysés à pH 7,2), et une solution de pepsine à 100 $\mu\text{g/ml}$.

La pepsine n'étant pas anticomplémentaire à cette concentration, et le titre des antigènes ne s'étant pas modifié par séjour à 37°, on peut constater une baisse progressive du titre des antigènes dans les deux cas, par incubation en présence de pepsine, baisse qui atteint près de la moitié du titre après 3 heures. Néanmoins, il n'a pas été possible d'obtenir, dans ces conditions expérimentales, la disparition totale de l'activité antigénique.

3 - RIBONUCLEASE ET DESOXYRIBONUCLEASE

Nos antigènes ont été soumis à l'action de ribonucléase et de désoxyribonucléase cristallisées, à la concentration finale de 100 $\mu\text{g/ml}$, puis examinés par fixation du complément.

Ce traitement n'a entraîné aucune modification du titre antigénique.

En conclusion, l'action de la pepsine sur l'activité fixant le complément des antigènes herpétique et poliomyélitique permet de penser que la fraction active est de nature protéique, bien que nous n'ayons pu tirer aucune conclusion de l'action de la trypsine en raison du pouvoir anticomplémentaire de celle-ci. L'absence d'action des nucléases n'exclut pourtant pas complètement la présence possible d'acides nucléiques, qui, liés à la fraction protéique, auraient échappé à l'action de ces enzymes.

VIII - ESSAI DE CARACTERISATION CHIMIQUE DE L'ANTIGENE HERPETIQUE

Cette étude a porté exclusivement sur l'antigène herpétique, pour lequel la chromatographie, comme nous l'avons vu, nous a permis d'obtenir des fractions actives dans la fixation du complément, mais dépourvues de pouvoir infectieux, ce qui n'était pas le cas pour le virus poliomyélitique.

1 - CARACTERISATION DES PROTEINES

Réaction à la ninhydrine

Avant de pratiquer cette réaction, nous avons procédé à l'hydrolyse acide de deux fractions de deux chromatographies différentes, qui s'étaient révélées antigéniques par fixation du complément, et privées de pouvoir infectieux par titrage sur cellules. L'ébullition pendant 12 heures en présence d'acide chlorhydrique 6 N a été suivie de l'élimination de celui-ci sous pression réduite, l'hydrolysât étant repris deux fois de suite dans l'eau distillée.

Nous avons traité en parallèle un échantillon de même volume de sérum de veau, qui nous a servi de témoin positif.

A 4 ml de chacun de ces hydrolysats, auxquels nous avons joint 4 ml de solutions de concentrations connues et décroissantes (1000 μ g, 500 μ g, 100 μ g, et 50 μ g) de méthionine, nous avons ajouté 0,5 ml d'une solution de ninhydrine à 0,1 % dans l'acétone. Après ébullition 1 à 2 mn et refroidissement, il est apparu dans les tubes contenant l'hydrolysât de sérum de veau et la méthionine à 1000 μ g, 500 μ g et 100 μ g la coloration caractéristique, allant du bleu-violet intense à un bleu léger pour la concentration 100 μ g de méthionine. Mais la réaction est restée négative pour les tubes contenant 50 μ g de méthionine et les fractions chromatographiques de l'antigène herpétique.

Nous avons alors répété la réaction en opérant sur papier Whatman. Sur une bande de ce papier, nous avons déposé une goutte d'hydrolysât de

sérum de veau, une goutte de chacune des dilutions de méthionine, et une goutte des hydrolysats des fractions antigéniques de chromatographie. Nous avons surchargé ces deux dernières gouttes plusieurs fois. Puis nous avons ajouté sur chacune des gouttes une goutte de ninhydrine et passé le papier au four à 100° pendant quelques minutes. A ce moment, toutes les taches étaient colorées, et l'intensité du violet rosé des hydrolysats des fractions antigéniques était inférieure à celle correspondant à 50 μ g de méthionine.

2 - CARACTERISATION DES SUCRES

Réaction de Mölich

A 5 ml d'une fraction antigénique, mais non infectieuse de chromatographie, et d'autre part de solutions de concentration connue et décroissante de lactose (1000 μ g, 500 μ g et 100 μ g) nous avons ajouté 2 gouttes de solution d'X-naphtol à 5 %, puis introduit délicatement 3 ml d'acide sulfurique concentré. La réaction a été positive (anneau violet à la zone de contact) dans les tubes contenant 1000 et 500 μ g de lactose, mais est restée négative pour 100 μ g et les tubes contenant la fraction antigénique.

En conclusion, la nature protéique de l'antigène herpétique, que laissaient présumer d'une part sa précipitabilité par le sulfate d'ammonium, d'autre part sa sensibilité à l'action de la pepsine, est confirmée par la positivité de la réaction à la ninhydrine. Cependant la faible intensité de celle-ci nous amène à souligner une fois de plus, l'infime concentration pondérale du produit actif au regard de sa réactivité sérologique. D'autre part, la négativité de la réaction de Mölich nous permet de supposer l'absence de sucres, ou leur présence à une concentration inférieure au seuil de sensibilité de cette réaction, absence que confirme par ailleurs le manque d'activité résiduelle dans le surnageant obtenu par précipitation par l'acide trichloracétique à 10 % d'une préparation antigénique, expérience que nous n'avons pas rapportée en détail, étant donné les difficultés d'interprétation en raison des risques de dénaturation au cours d'un procédé aussi énergique.

IX - CARACTERES IMMUNOLOGIQUES

A - ANTIGENE HERPETIQUE

1 - POUVOIR IMMUNOGENE

L'immunisation de lapins avec des antigènes fixant le complément (préparés sur membranes chorio-allantoïques ou sur cellules de rein de lapin) et privés, par traitement à l'éther, de pouvoir infectieux, a été suivie de

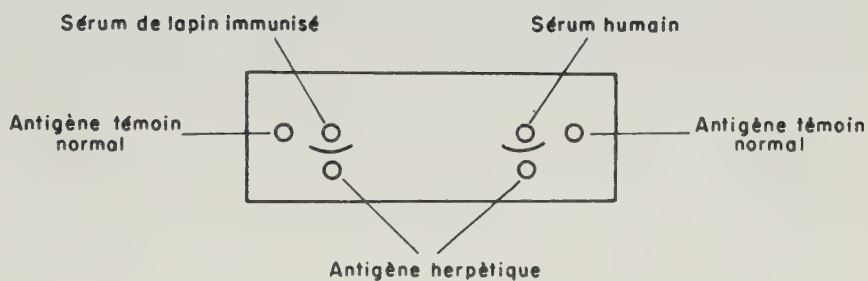


Fig. 28 - Réactions de précipitation avec l'antigène herpétique.

l'apparition d'anticorps fixant le complément : la fraction active dans la fixation du complément n'est donc pas un haptène, mais bien un antigène, capable de provoquer *in vivo* la formation d'anticorps, encore que l'on puisse concevoir que le virus total, privé par le traitement à l'éther de son pouvoir infectieux, conserve ses propriétés antigéniques.

2 - POUVOIR PRECIPITANT

Mademoiselle le Dr N. Grasset, qui a obtenu, dans le cadre d'une étude générale des réactions de précipitation avec différents virus (57), des résultats positifs avec le virus herpétique (cultivé sur cellules de rein de singe et sur cellules KB), a bien voulu pratiquer pour nous une réaction de précipitation en gélose, selon la microméthode décrite par Grasset *et al.* (56); le schéma de la figure 28 donne les résultats de cette réaction, pratiquée avec un sérum de lapin immunisé, et répétée avec un sérum humain immun, et un de nos antigènes fixant le complément, 500 fois concentré, et son témoin normal concentré dans les mêmes proportions (à un plus faible taux de concentration, les résultats ont été négatifs). La ligne de précipitation entre les sérums immuns et l'antigène herpétique, en l'absence de toute réaction entre le sérum et le matériel normal, traduit une réaction de précipitation spécifique.

L'antigène fixant le complément serait donc responsable de la réaction de précipitation, comme ce semble être le cas pour le virus poliomyélitique, ainsi que le montrent les travaux de Le Bouvier *et al.* (90) et Le Bouvier (89). Faute de matériel suffisamment concentré, nous n'avons pu tenter de réaction de précipitation avec nos propres antigènes poliomyélitiques.

B - ANTIGENE POLIOMYELITIQUE

POUVOIR IMMUNOGENE

Le virus poliomyélitique n'étant pas sensible à l'éther et d'autre part, le chauffage à température assez élevée pour détruire le pouvoir infectieux faisant disparaître la plus grande partie de l'activité antigénique il était beaucoup plus difficile d'étudier le pouvoir immunogène d'antigènes fixant le complément qui ne soient pas infectieux.

X - CONCLUSION

Dans le cas du *virus herpétique*, l'activité antigénique fixant le complément est supportée, au moins en partie, par une particule de taille inférieure à celle de la particule infectieuse, séparable de celle-ci par ultra-

centrifugation et par chromatographie ; si les particules virales interviennent, c'est par un de leurs éléments constitutants qui n'a pas de rôle dans le pouvoir infectieux (ultracentrifugation précédée de l'inactivation par l'éther du pouvoir infectieux). En outre, la séparation effective par chromatographie, dans des conditions rigoureusement contrôlées, du pouvoir antigénique et du pouvoir infectieux, permet de penser que l'activité fixant le complément restée liée aux particules virales dans les expériences d'ultracentrifugation, peut provenir de contamination par l'antigène séparable, qu'il a été impossible d'éliminer totalement par ce procédé.

D'autre part, cette activité antigénique, stable dans la zone de pH comprise entre 6 et 9, est relativement thermolabile, puisqu'elle est détruite par séjour de 30 minutes à 60°. Cette thermolabilité, sa précipitabilité par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, (spectre d'absorption à 280 m μ du précipité ainsi obtenu), sa sensibilité à l'action de la pepsine amènent à conclure à la *nature protéique* de cet antigène, qu'a confirmée la réaction positive à la ninhydrine. La résistance de cette activité à l'éther (qui, par ailleurs, supprime le pouvoir infectieux du virus herpétique), bien que n'excluant pas formellement la présence de lipo-protéines qui ne seraient pas atteintes par ce traitement, permet de penser que les lipides n'interviennent pas directement dans cette activité. Enfin, la fraction active dans la fixation du complément est antigénique (immunisation d'animaux) et donne lieu à des réactions de précipitation.

Pour le *virus poliomyélitique*, la situation se présente différemment : les ultracentrifugations ne laissent pas subsister d'activité antigénique dans le surnageant, et on peut penser que celle-ci est associée aux particules-virus elles-mêmes, ce que confirment les chromatographies pratiquées sur deux souches de virus d'un même type, dont les propriétés d'élution sont connues et distinctes, et qui ne nous ont pas permis de séparer les deux activités, antigénique et infectieuse. Cependant, les résultats obtenus avec différents agents, tels que le formol (16), chaleur, rayons ultra-violets (129), etc..., et les études de Mayer *et al.* (106) portant à croire qu'il existe deux fractions (composés «C» et «D») responsables de la fixation du complément, il faut admettre que ces deux particules sont de taille très voisine (séparation seulement par centrifugation en présence d'un gradient de concentration en saccharose) et de propriétés de surface peu différentes. En outre, les caractères physiques du virus (résistance à l'éther, à la chaleur) ne permettent pas, contrairement au cas du virus herpétique, d'action différentielle sur l'une ou l'autre des activités.

CHAPITRE V

DISCUSSION GENERALE

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, une classe homogène d'antigènes viraux fixant le complément, mais des résultats groupés autour de virus particuliers. En discutant ceux que nous avons obtenus à l'occasion de l'étude des virus herpétique et poliomyélitique, nous rappellerons les grandes lignes que l'on peut dégager des travaux consacrés à ce problème.

Les méthodes de préparation de ces antigènes sont encore souvent empiriques, car un souci pratique a guidé les recherches : celui d'obtenir, dans des conditions faciles et rapides, des préparations actives pour le diagnostic sérologique *in vitro* des maladies à virus.

I - METHODES DE PREPARATION DES ANTIGENES FIXANT LE COMPLEMENT; ETUDE DE LA SENSIBILITE ET DE LA SPECIFICITE DES ANTIGENES OBTENUS

Dans le cas qui nous occupait, plusieurs sources de virus étaient à notre disposition, à propos desquelles avaient été décrites différentes méthodes d'extraction : méthode de Casals (25) pour les cerveaux de lapin pour le virus herpétique ou de souriceau pour le virus poliomyélitique; de Hayward (63), Dudgeon (40), Brown (19) pour les antigènes herpétiques préparés sur membranes chorio-allantoïques d'oeufs embryonnés, de Gajdusek *et al.* (50) pour les liquides allantoïque et amniotique d'oeufs infectés d'herpès. Nous avons comparé la valeur des antigènes ainsi obtenus et tenté, sans succès, d'en augmenter le titre en faisant varier différents facteurs. Les titres antigéniques faibles et la masse importante de matériel étranger difficile à éliminer ne nous permettaient pas d'appliquer directement l'une ou l'autre de ces techniques à l'étude que nous proposons : celle des relations entre pouvoir antigénique et pouvoir infectieux et celle de la nature de la fraction active dans la fixation du complément. Les cultures cellulaires étaient plus favorables à cette étude :

pourtant les surnageants de culture ne se sont pas toujours révélés aussi satisfaisants qu'on pouvait l'espérer; Whitney (164), Ealducci *et al.* (8) ont pour le virus herpétique reconnu leur peu de succès en la matière, tandis que les différents essais de Svedmyr *et al.* (157), Schmidt et Lennette (139), entre autres, soulignent les difficultés rencontrées pour le virus polio-myélitique.

Nous avons mis au point une *méthode d'extraction* des antigènes fixant le complément à *partir de la phase cellulaire* des cultures du virus, cellules de rein de lapin ou cellules KB le plus souvent pour le virus herpétique, cellules KB pour le virus poliomyélitique. Il est possible, par ce procédé, d'*augmenter le titre antigénique* des préparations en recueillant le contenu des cellules dans un volume réduit de diluant. Ces antigènes, utilisés pour les diagnostics sérologiques de routine, sont dépourvus de pouvoir anticomplémentaire et se sont révélés sensibles et spécifiques. Cependant nous avons constaté l'existence de réactions inattendues entre les antigènes d'origine KB et les sérums d'animaux immunisés, et nous avons indiqué comment ces réactions ont été supprimées par purification, dans un stade ultérieur, des antigènes à l'éther.

Cette méthode est applicable à l'étude d'autres virus cultivés sur cellules *in vitro*, et Sureau (156) et Robba et Virat (127) ont préparé de cette manière des antigènes pour fixation du complément avec les virus Cocksackie des groupes A et B respectivement.

II - ETUDE DE LA RELATION DES POUVOIRS ANTIGENIQUE ET INFECTIEUX

Cette méthode d'extraction nous a fourni le moyen d'étudier la relation dans le temps du pouvoir antigénique et du pouvoir infectieux; en interrompant à des temps donnés l'évolution de l'infection, on peut en effet apprécier les titres antigéniques et infectieux des deux phases, cellulaire et liquide, des cultures, et tracer ainsi la courbe d'apparition de l'un et de l'autre.

1 - EXPRESSION DES RESULTATS

L'obligation dans laquelle nous étions de concentrer le matériel antigénique pour l'étudier a naturellement entraîné un certain caractère artificiel des résultats obtenus. Nous avons introduit un *facteur de correction*, fonction du taux de concentration respectif imposé aux phases liquide ou cellulaire des cultures. En procédant à l'*analyse statistique des résultats* groupés au cours de ces expériences, nous avons, d'autre part, constaté que les variations d'une expérience à l'autre des titres infectieux ne dépassaient pas celles que l'on devait attendre de la méthode de titrage

appliquée, sauf pour les valeurs correspondant aux phases cellulaires, et nous avons examiné la part prise par les différents facteurs de variation.

2 - CARACTERE INTRACELLULAIRE DE L'ANTIGENE HERPETIQUE

L'étude parallèle des pouvoirs antigénique et infectieux nous a permis de montrer que, dans le cas du virus herpétique, l'activité antigénique fixant le complément était très vraisemblablement restreinte à la phase cellulaire des cultures : les surnageants ne deviennent que tardivement actifs, au moment seulement où les cellules, détruites par le virus, libèrent leur contenu dans le milieu.

Schmidt *et al.* (140), dans un travail récent, consacré à la préparation d'antigènes herpétiques fixant le complément sur cellules d'embryon de poulet, insistent sur la nécessité, pour obtenir un titre convenable, de joindre aux surnageants de culture les débris cellulaires infectés.

Wildy et Holden (166) dans une étude semblable, mais sur oeufs embryonnés, mettaient déjà l'accent sur le caractère intracellulaire probable de l'antigène fixant le complément du virus herpétique.

A propos du virus grippal, Hoyle (74) faisait la même remarque : l'antigène « soluble » pourrait correspondre à la forme intracellulaire non infectieuse du virus.

Plus récemment, Black (13) soulignait la présence de l'antigène fixant le complément du virus de la rougeole à l'intérieur des cellules infectées, bien avant qu'aucun pouvoir antigénique ne soit décelable dans le milieu.

III - DISTINCTION ENTRE POUVOIRS ANTIGENIQUES DES VIRUS HERPETIQUE ET POLIOMYELITIQUE

Par contre, Roizman *et al.* (128) ont trouvé la fraction antigénique « C » du virus poliomyélitique dans la phase intracellulaire et dans la phase extracellulaire. Ceci confirmerait les résultats de l'expérience II décrite au chapitre III, dans laquelle nous avons tenté de concentrer le matériel extracellulaire : ce serait par manque de concentration que, dans le cas du virus poliomyélitique, on ne retrouve pas régulièrement d'activité antigénique dans les surnageants de culture.

Les études de Lebrun (91, 92) avec les anticorps marqués à la fluorescéine permettent de suivre l'évolution intracellulaire de l'antigène : celui-ci, dans le cas du virus herpétique, ne migre vers le cytoplasme qu'après s'être accumulé lentement dans le noyau, alors que pour le virus

poliomyélitique, l'apparition de l'antigène, précoce dans le cytoplasme, n'est suivie que tardivement de son passage dans le noyau. Pourtant nous ignorons ce que les anticorps fluorescents nous permettent de déceler, les particules-virus elles-mêmes ou un antigène qui en serait distinct. Nous ne pouvons guère tirer de conclusion de l'opposition des résultats fournis par cette technique pour les virus herpétique et poliomyélitique.

Plus riche en informations est peut-être l'observation faite par Ackermann et Kurtz (2) du rôle possible joué par les mitochondries dans la multiplication du virus herpétique. Si ces organites, dont on connaît l'intense activité enzymatique, étaient le siège de la synthèse de l'antigène fixant le complément, Wildy et Holden (166) font observer que la libération de celui-ci pourrait ne pas en être spontanée. Ada et Perry (3) suggèrent, d'autre part, que l'antigène « soluble » du virus grippal pourrait être assimilé chimiquement à la fraction microsomienne obtenue par centrifugation différentielle de cellules non infectées.

IV - INTERFERENCE ENTRE LE POUVOIR ANTIGENIQUE FIXANT LE COMPLEMENT ET LE POUVOIR INFECTIEUX DU VIRUS HERPETIQUE

La phase intracellulaire prolongée de l'antigène fixant le complément s'accompagne, dans le cas du virus herpétique, d'un autre fait particulier que nous avons observé au cours de cette étude : c'est le rôle exercé par l'antigène sur la formation ou tout au moins la libération hors de la cellule du virus infectieux. Nous avons évoqué à ce propos un phénomène d'interférence, que cette interférence ait pour intermédiaire une substance inhibitrice de type interféron, ou que l'antigène lui-même en soit à l'origine. Nous avons commenté à la fin du chapitre III les courbes d'évolution dans le temps des pouvoirs antigénique et infectieux, dont l'examen entraîne cette constatation. Sur cellules de rein de lapin ou sur cellules KB, le phénomène peut ne varier qu'en degré, mais non en nature : dans le premier cas, *pour tout taux d'infectiosité cellulaire inférieur à 1*, c'est-à-dire tel qu'il ne puisse assurer l'infection simultanée de toutes les cellules sensibles, les titres infectieux du virus intracellulaire sont inférieurs à ceux du virus libre, et tout se passe comme si l'antigène fixant le complément, lui aussi intracellulaire, exerçait une action retardatrice sur la libération d'une partie du virus infectieux. Le phénomène est plus évident encore sur cellules KB : là, les titres du virus infectieux, intracellulaire ou libre, sont très diminués. Dans certains cas, la libération du virus dans les surnageants de culture peut même être totalement inhibée, sauf au temps où la baisse du titre antigénique intracellulaire indique la lyse des cellules et la dispersion de leur contenu dans le milieu. Les titres antigéniques accrus dans ce cas traduisent sans doute le maintien de l'état

physiologique des cellules non entraînées dans le cycle normal de reproduction du virus : elles restent capables de produire, sinon le virus infectieux lui-même, tout au moins certains des éléments associés à sa multiplication tels que l'antigène fixant le complément.

Une conséquence directe de ce phénomène est l'*extinction*, que nous avons observée de façon régulière, du *pouvoir infectieux* de souches de virus herpétique par passages consécutifs sur cellules KB (il semble qu'il en soit de même sur cellules HeLa). Le risque d'échecs d'isolements de virus est une des incidences pratiques, qui intéressent les laboratoires de diagnostics, où de telles cellules sont utilisées pour l'examen de prélèvements infectés.

L'aspect théorique d'un tel phénomène est plus complexe, concernant aussi bien les rapports entre le virus infectieux et l'antigène fixant le complément, que ceux unissant le virus à la cellule-hôte.

Nous avons dit qu'il y avait interférence, semblait-il, pour un taux d'infectiosité inférieur à 1. On conçoit en effet que pour un virus aussi thermolabile que le virus herpétique [demi-vie de 5 heures à 37°, Stoker (153)], les particules infectieuses, progressivement libérées et progressivement inactivées, viennent interférer avec la production de nouvelles particules infectieuses, rappelant en cela le phénomène de von Magnus (102), dont Finter *et al.* (47), Paucker et Henlé (113, 114) en particulier, ont donné diverses analyses expérimentales. Schlesinger (136) a, en outre, signalé que le cerveau de la souris pouvait être le siège d'un cycle de multiplication incomplet du virus grippal, avec production d'hémagglutinine et d'antigène fixant le complément, sans augmentation concomitante du titre infectieux.

D'autre part, Henlé *et al.* (65), en cultivant différentes souches de virus grippal sur cellules HeLa, arrivent au même résultat : pas d'accroissement du virus infectieux, mais augmentation de la teneur en hémagglutinine et en antigène fixant le complément ; ce matériel viral, mais non infectieux, n'est pas libéré des cellules avant leur destruction. Granoff (55) d'une part, Nadel et Eisenstark (110) d'autre part ont prouvé l'existence de telles formes non infectieuses pour un autre virus du groupe des Myxovirus, le virus de la maladie de Newcastle.

Nous serions donc amenée à considérer l'antigène fixant le complément du virus herpétique comme une sorte de virus incomplet, un stade auquel, dans certaines conditions, défavorables pour le virus (mais favorables pour la cellule), s'arrêterait le cycle de croissance du virus. Que parallèlement il apparaisse une certaine proportion de virus infectieux, on peut aisément l'expliquer en admettant que les cellules, infectées à l'origine et déjà engagées dans le cycle de reproduction du virus, poursuivent celui-ci.

Nous ne savons pas si cette interruption dans le processus normal de multiplication du virus s'accompagne de la production d'interféron ou d'une substance inhibitrice analogue. Pourtant de l'avis de plusieurs auteurs [Isaacs (77), Ho et Enders (70)], le virus herpétique est peu sensible à l'action de l'interféron. D'autre part, l'inhibition de la multiplication ou de la libération du virus infectieux ne s'accompagne pas ici de la disparition de l'antigène fixant le complément, comme c'est le cas pour le virus grippal (79) ou les adénovirus (116), mais au contraire de l'augmentation de son titre. Mais si, comme Isaacs (77) en a émis l'hypothèse, « la production d'interféron correspond à la production d'un intermédiaire viral qui apparaît précocement dans le cycle vital du virus », cet intermédiaire pourrait bien être l'antigène fixant le complément ; l'interférence étant alors un « blocage, à un stade intracellulaire précoce, de la synthèse virale ».

Enfin, nous voudrions rapprocher le comportement du virus herpétique tel que nous l'avons observé en culture cellulaire et un problème aussi particulier que celui de l'herpès récurrent chez l'homme. Si la situation était la même *in vivo* qu'*in vitro*, l'antigène fixant le complément pourrait être cette « forme non infectieuse analogue au prophage présent dans les bactéries lysogènes » évoquée par Burnet (22, p. 269). C'est sous cette forme, produite par certaines cellules à la suite de l'infection primaire, sans qu'elles en soient apparemment atteintes, que pourrait subsister le virus dans les intervalles qui séparent les récurrences. Cette forme non infectieuse, antigène fixant le complément ou virus incomplet, serait le stimulus qui provoquerait la formation des anticorps fixant le complément trouvés chez les sujets atteints d'herpès récurrent (22, p. 334).

V - IMPOSSIBILITE DE SEPARER, DANS LE CAS DU VIRUS POLIO-MYELITIQUE, POUVOIR INFECTIEUX ET POUVOIR ANTIGENIQUE

Tous les faits que nous venons d'analyser à propos du virus herpétique ont mis en évidence le non-parallélisme, dans le cas de ce virus tout au moins, entre pouvoir infectieux et antigénique. Pour le virus poliomyélique, il n'en est pas de même et nous avons vu que seule l'impossibilité de concentrer suffisamment les surnageants de culture ne nous a pas permis de mettre régulièrement en évidence leur pouvoir antigénique. D'autre part, la synthèse ou la libération du virus ne témoignent d'aucun phénomène comparable à celui observé pour le virus herpétique. Enfin, l'étude physique de préparations à la fois infectieuses et antigéniques du virus poliomyélique ne nous a pas permis de dissocier les deux activités, que ce fût par ultracentrifugation à une vitesse telle que précipite la plus grande partie des particules-virus, ou par chromatographie sur colonne de DEAE cellulose de deux souches différentes connues pour leurs propriétés d'élution distinctes [Delsal *et al.* (39)]. Il est vrai que, s'il existe deux fractions qui

interviennent à des degrés divers dans l'activité antigénique fixant le complément (Fraction «C») et le pouvoir infectieux (Fraction «D»), leur taille est si voisine que seule une centrifugation dans un gradient de concentration permet de les dissocier [Schwerdt (141)]. Il n'en reste pas moins que cette fraction «C», très peu infectieuse et support de la plus grande partie de l'activité antigénique fixant le complément équivaut alors à un antigène «soluble», c'est-à-dire séparable des particules infectieuses, de vitesse de sédimentation supérieure, représentées par la fraction «D». Dans ce cas, la situation ne serait pas absolument différente de celle rencontrée à propos de nombreux autres virus, pour lesquels l'activité antigénique fixant le complément serait supportée, pour partie, par une particule de petite taille, inférieure à celle de la particule-virus elle-même (antigène «soluble») et pour une autre par cette particule-virus (antigène «viral») (85). Cette situation est celle, entre autres, du virus vaccinal, à propos duquel Craigie (34) mit en évidence le premier antigène «soluble», celle du virus grippal : Hoyle et Fairbrother (75) ont indiqué, les premiers, l'existence de cet antigène qu'étudièrent ensuite Hoyle lui-même et le groupe de Henlé. Henlé *et al.* (66) ont de même montré qu'il existait deux antigènes pour le virus ourlien, et Schäfer *et al.* (135) pour le virus de la peste aviaire. Bradish *et al.* (17), Randrup (124) ont d'autre part étudié un système analogue pour le virus de la fièvre aphteuse. Enfin, certains virus des plantes ne semblent pas avoir un comportement sérologique différent, ainsi pour le virus du jaunissement du navet : il existe un composé protéique associé au virus («top component») mais non infectieux et qui ne contient pas d'acide ribonucléique [Markham et Smith (103)].

VI - EXISTENCE D'UN ANTIGÈNE HERPÉTIQUE FIXANT LE COMPLÉMENT SÉPARABLE DU VIRUS INFECTIEUX

Nous avons confirmé l'existence de cet antigène séparable que nous avons retrouvé, quel que fût l'origine du matériel de départ (membranes chorio-allantoïques, liquides allantoïques et amniotiques d'oeufs embryonnés, ou cultures cellulaires), que Hayward (63), Brown (19), Wildy et Holden (166) avaient étudié sur oeufs. Nous n'avons pu éliminer par lavages des culots d'ultracentrifugation le pouvoir antigénique lié aux particules-virus, et nous avons, à cette occasion, mis en évidence deux types de réactivité distincts présentés par les sérums immuns : celui correspondant à la présence d'anticorps anti-S et anti-V de sérums prélevés après une infection récente ou une réinfection et celui de sérums ne contenant que des anticorps anti-V correspondant à une infection plus ancienne [Lippelt et Söltz-Szöts (99)].

La chromatographie nous a, en outre, fourni le moyen de dissocier activité antigénique et pouvoir infectieux. Ceci était une preuve supplé-

mentaire de l'existence de deux particules, support de ces activités. Polley (123) en a apporté récemment une autre preuve encore par l'étude de la sensibilité des deux activités aux rayons gamma.

Taverne et Wildy (158) ont de même obtenu la séparation de ces activités par chromatographie sur colonne de phosphate pour un antigène préparé sur oeufs. Brown et Cartwright (20) d'une part, et Polatnick (119) d'autre part ont rendu compte de résultats comparables pour le virus de la fièvre aphteuse.

VII - CARACTERISATION CHIMIQUE DE L'ANTIGENE HERPETIQUE : SA NATURE PROTEIQUE

La séparation entre activité antigénique et pouvoir infectieux une fois effectuée, nous avons pu, ce qui fut impossible pour le virus polio-myélitique, étudier la nature chimique de l'antigène fixant le complément : la réaction à la ninhydrine a confirmé sa nature protéique, que laissaient supposer sa sensibilité à la pepsine, sa précipitabilité par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, et la courbe d'absorption à 280 $m\mu$ du précipité ainsi obtenu.

VIII - CONCLUSIONS

Il est intéressant de rapprocher la constante de sédimentation calculée pour l'antigène herpétique, $S_{20} = 4,25$, de celle trouvée pour la « protéine A », résultant de la désagrégation du virus de la mosaïque du tabac, $S_{20} = 4,6$, et correspondant à des « sous-unités protéiques, solubles, dans un état limité d'agrégation » (86). Il est ainsi séduisant d'assimiler cet antigène herpétique, de nature protéique reconnue, aux sous-unités protéiques, dont l'existence théorique avancée par Crick et Watson (35) pour un certain nombre de virus a été prouvée depuis au microscope électronique grâce à la méthode à l'acide phosphotungstique de Brenner et Horne (18), pour le virus herpétique par Wildy *et al.* (167) et pour le virus poliomyélitique par Horne et Nagington (71). L'antigène fixant le complément pourrait ainsi correspondre à ces sous-unités [« capsomères », Lwoff *et al.* (100)] non incorporées, d'autant que certaines images montrent des « capsides » vides, et que les travaux de Morgan (107, 108) et de Falke *et al.* (44) permettent de penser que la seconde membrane caractéristique des particules ne s'acquiert qu'au passage dans le cytoplasme.

Depuis quelques années, plusieurs publications se sont succédées, mettant en évidence le pouvoir infectieux des acides ribonucléiques extraits des préparations virulentes : Gierer et Schramm (54) pour le virus de la

mosaïque du tabac, Colter *et al.* (32), Alexander *et al.* (4) pour le virus poliomyélitique, A. Thomas et Leclerc (159, 160) pour le virus de la fièvre aphteuse. Si l'acide ribonucléique est porteur de l'information génétique du virus, on peut supposer que la couche protectrice de protéine est responsable de l'activité antigénique.

Plusieurs études consacrées à l'action de la proflavine sur la synthèse de différents virus vont dans le sens de cette hypothèse : Ledinko (94) pour le virus poliomyélitique, Franklin (45) pour le virus de la peste aviaire et Brown et Stewart (21) pour le virus de la fièvre aphteuse ont en effet constaté que la proflavine n'inhibait pas la production d'antigène fixant le complément, tandis que le pouvoir infectieux était affecté. Par assimilation avec les résultats obtenus à l'occasion de l'action de la proflavine sur la synthèse des phages, on peut penser que ce produit entrave l'incorporation de l'acide ribonucléique dans le virus complet.

Dans ces conditions, l'antigène fixant le complément pourrait être un constituant normal de la particule-virus complète, mais dont l'incorporation serait à des degrés divers inhibée, peu ou pas du tout dans le cas d'un virus tel que le virus poliomyélitique, beaucoup plus pour un virus comme le virus herpétique. Dans ce dernier cas, l'antigène, sorte de virus incomplet, résultat d'une synthèse anormale du virus, orienterait la cellule vers la synthèse d'antigène plutôt que de virus infectieux, en interférant, par exemple, avec la formation de nouvelles particules infectieuses.

Cette nouvelle orientation donnée au métabolisme cellulaire pourrait être le mécanisme grâce auquel la cellule, réagissant à l'invasion du virus, réussit à maintenir avec celui-ci un certain équilibre. Ce serait là un des aspects positifs du processus de reproduction des virus dont le rendement est bien souvent médiocre : Stoker (135) fournit, de la multiplication du virus herpétique sur cellules HeLa, une analyse significative en ce sens, et souligne le « gaspillage » de particules virales auquel aboutit un tel processus. Il est possible que l'antigène fixant le complément représente, dans ces conditions, un de ces produits résiduels qui, d'après Burnet (22, p. 201), seraient, dans de nombreux cas, associés à la multiplication des virus.

CHAPITRE VI

CONCLUSIONS GENERALES

Notre connaissance théorique des antigènes viraux fixant le complément est encore fragmentaire. Nous savons peu de choses en particulier sur leur rôle dans la multiplication des virus qu'ils accompagnent, et pourtant ils présentent un grand intérêt pratique : ils permettent le diagnostic rapide et facile des maladies à virus.

En abordant l'étude des antigènes fixant le complément des virus herpétique et poliomyélitique (deux virus qu'un certain nombre de caractères différencient), notre but était, d'une part d'obtenir des antigènes spécifiques et sensibles pour chacun de ces virus, d'autre part d'analyser la relation qui unit pouvoir infectieux et pouvoir antigénique tant au niveau de la cellule qu'au point de vue physique, chimique et immunologique.

Nous avons à notre disposition un certain nombre de méthodes élaborées à l'occasion de la culture de ces virus sur différents hôtes animaux. Nous avons décrit les lésions qui accompagnent le développement de ces virus et étudié les différents facteurs susceptibles d'augmenter le titre des antigènes.

Mais, pour adapter à ces problèmes les cultures cellulaires qui devaient nous permettre d'accroître les titres antigéniques et de supprimer la masse importante de matériel étranger peu favorable à une étude chimique précise, nous avons mis au point une méthode qui consiste en *l'extraction à partir des cellules infectées de l'antigène* fixant le complément, les surnageants de culture s'étant révélés inconstants ou négatifs. En réduisant le volume de diluant destiné à l'extraction, il est possible d'augmenter le titre des préparations antigéniques. Cette technique est la même dans son principe pour les virus herpétique et poliomyélitique, et ne diffère que par la nature des cellules choisies pour la culture des virus (cellules de rein de lapin ou cellules KB), et peut être appliquée à la *préparation d'antigènes d'autres virus cultivés in vitro*.

Nous avons, par ailleurs, insisté sur le contrôle de la *sensibilité* et de la *spécificité* des antigènes obtenus. Nous avons en effet constaté l'existence de réactions entre cellules KB normales et certains sérums immuns : nous avons supprimé ces réactions en purifiant les antigènes à l'éther.

La même méthode d'extraction à partir de la phase cellulaire des cultures a été adoptée pour l'étude de l'évolution dans le temps des pouvoirs infectieux et antigénique de chacun des virus. On interrompt, à des temps donnés après l'infection, l'évolution de celle-ci, et on apprécie d'une part le pouvoir infectieux, d'autre part le pouvoir antigénique à la fois des phases cellulaires et liquides des cultures. Nous avons défini le *taux d'infectiosité cellulaire* qui nous a servi d'élément de comparaison d'une expérience à l'autre, et le mode d'expression des résultats, en indiquant le *facteur de correction* introduit en raison de la concentration préalable et indispensable à l'étude du pouvoir antigénique. La *précision des titres infectieux* a été calculée et les variances obtenues nous ont permis, par l'analyse statistique des résultats de constater que les variations d'une expérience à l'autre ne dépassaient pas, en général, les limites impliquées par la méthode de titrage adoptée ; dans le cas contraire, nous avons discuté la part prise par les facteurs de variation.

C'est ainsi que nous sommes parvenue aux conclusions suivantes.

I - CARACTERE INTRACELLULAIRE DE L'ANTIGENE HERPETIQUE

Il a été établi au cours de l'étude de l'évolution des pouvoirs infectieux et antigénique du virus herpétique cultivé sur cellules de rein de lapin ou sur cellules KB. Quel que soit le taux d'infectiosité cellulaire, on ne peut mettre en évidence d'activité antigénique dans les surnageants de culture.

II - INTERFERENCE ENTRE LE POUVOIR ANTIGENIQUE ET LE POUVOIR INFECTIEUX DU VIRUS HERPETIQUE

Ce phénomène est apparu lorsque le taux d'infectiosité cellulaire a été réduit et maintenu inférieur à 1 (toutes les cellules sensibles ne sont pas infectées simultanément). Les titres infectieux du virus intracellulaire n'atteignent alors leur maximum qu'avec retard par rapport à ceux du virus libre. Les titres antigéniques intracellulaires sont, par contre, élevés, et tout se passe comme si l'antigène intracellulaire exerçait sur la synthèse ou la libération d'une partie des particules infectieuses

une action inhibitrice qui ne s'annule qu'à la fin du cycle infectieux, c'est-à-dire à la lyse des cellules.

Sur cellules KB, les titres infectieux sont toujours inférieurs à ceux obtenus sur cellules de rein de lapin, et dans certain cas, la libération du virus infectieux peut être inhibée jusqu'à un stade avancé. Les titres antigéniques élevés indiquent que les cellules qui n'ont pas subi d'effet cytopathogène sont capables de synthétiser les éléments associés à la multiplication du virus.

Ceci, rapproché du caractère intracellulaire de l'antigène, nous a amenée à le considérer comme un produit intermédiaire dans la synthèse du virus complet, et capable d'exercer, avec ou sans intervention d'une substance inhibitrice de type interféron, une *action d'interférence* avec la production du virus infectieux.

D'autre part, nous avons observé, en conséquence directe des résultats obtenus sur cellules KB, la *suppression du pouvoir cytopathogène* de souches de virus herpétique par passages consécutifs sur ces cellules.

III - EXISTENCE D'UN ANTIGÈNE HERPÉTIQUE FIXANT LE COM- PLEMENT SEPARABLE DU VIRUS INFECTIEUX

Par *ultracentrifugation*, il a été possible de précipiter la plus grande partie des particules infectieuses, sans pour autant supprimer toute activité antigénique du surnageant. Nous avons ainsi confirmé l'existence d'un antigène séparable, dont la constante de sédimentation $S_{20} = 4,25$ indique que l'on a affaire à des particules de taille nettement inférieure à celle du virus.

Nous avons, de même, par *chromatographie* sur DEAE cellulose, obtenu la séparation des pouvoirs infectieux et antigénique, opérant en outre une purification de l'une et l'autre fractions, support de ces activités. Leur sensibilité différente à divers agents, tels que température, éther, pH, laissait déjà soupçonner cette dualité.

IV - CARACTÉRISATION CHIMIQUE DE CET ANTIGÈNE : SA NATURE PROTEIQUE

L'isolement à l'état pur de la fraction active dans la fixation du complément nous a permis de l'identifier. Sa nature protéique, qu'évoquaient sa sensibilité à la chaleur, à l'action de la pepsine, sa précipitabilité par le

sulfate d'ammonium à demi-saturation et le spectre d'absorption à 280 m μ du précipité ainsi obtenu, a été confirmée par la positivité de la réaction à la ninhydrine. Cependant la faible intensité de celle-ci est une indication supplémentaire de l'infime concentration pondérale du produit sérologiquement actif.

V - POUVOIR ANTIGENIQUE FIXANT LE COMPLEMENT DU VIRUS POLIOMYELITIQUE

Les résultats sont distincts de ceux obtenus à propos du virus herpétique. L'évolution des pouvoirs infectieux et antigénique intracellulaires est parallèle. Nous n'avons pu apporter de preuve certaine du caractère intracellulaire obligatoire de l'antigène fixant le complément. La concentration insuffisante des surnageants de culture peut être à l'origine de l'absence de pouvoir antigénique de ceux-ci. Les titres antigéniques sont restés faibles dans tous les cas, en opposition avec les titres infectieux élevés caractéristiques de ce virus.

VI - IMPOSSIBILITE DE SEPARATION DU POUVOIR INFECTIEUX ET DU POUVOIR ANTIGENIQUE DU VIRUS POLIOMYELITIQUE

La centrifugation comme la chromatographie ont échoué à séparer pouvoirs infectieux et antigénique. S'il existe deux particules, leur taille et leurs propriétés sont très voisines, puisque ces activités ne résistent différemment à aucun des agents essayés. La fraction antigénique, s'il en existe, n'ayant pas été isolée des particules infectieuses, n'a pu être étudiée chimiquement.

VII - CONCLUSION

Nous avons discuté la place occupée par les antigènes fixant le complément des deux virus que nous avons étudiés parmi les antigènes connus d'autres virus et rapproché nos résultats des connaissances actuelles sur ce sujet.

Nous avons conclu que l'antigène fixant le complément, constituant intracellulaire obligatoire, pourrait être considéré comme un produit intermédiaire dans la synthèse de la particule virale infectieuse complète et entrant dans la constitution de celle-ci, mais dont l'incorporation serait, à des degrés divers, incomplète. C'est ainsi que pour le virus herpétique,

en particulier sur cellules KB, la cellule serait orientée vers la production d'antigène aux dépens du virus infectieux, et cette déviation pourrait être le résultat d'un blocage, à un stade précoce, de la synthèse du virus complet et infectieux, blocage exercé avec ou sans intervention d'une substance inhibitrice de type interféron. Pour le virus poliomyélitique, ce blocage n'aurait pas lieu, et tout le matériel antigénique serait incorporé dans la particule infectieuse, sans laisser de produit résiduel. L'étude d'autres virus, dont les caractères se rapprocheraient de ceux de chacun des virus que nous avons choisis, pourrait confirmer ces vues.

BIBLIOGRAPHIE

- 1.- Ackermann W.W., Cellular aspects of the cell-virus relationship, **Bact. Rev.**, 1958, **22**, 223-239.
- 2.- Ackermann W.W. et Kurtz H.B., The relation of herpes virus to host cell mitochondria, **J. exp. Med.**, 1952, **96**, 151-157.
- 3.- Ada G.L. et Perry B.T., Studies on the soluble complement fixing antigens of influenza virus. III. The nature of the antigens, **Austr. J. exp. Biol. med. Sci.**, 1954, **32**, 177-185.
- 4.- Alexander H.E., Koch G., Moutain-Morgan I. et van Damme O., Infectivity of ribonucleic acid of poliovirus on HeLa cell monolayers, **Virology**, 1958, **5**, 172-173.
- 5.- Anderson K., Pathogenesis of **herpes simplex** virus infection in chick-embryos, **Amer. J. Path.**, 1940, **16**, 137-157.
- 6.- Artzet F., Antigène herpétique fixant le complément, **Ann. Inst. Pasteur**, 1960, **99**, 777-783.
- 7.- Artzet F., Antigène poliomyélitique pour fixation du complément, **Ann. Inst. Pasteur**, 1960, **99**, 852-858.
- 8.- Balducci D., Tyrrel D.A.J. et Stuart-Harris C.H., Complement fixing antigens of **herpes simplex** virus, **Arch. ges. Virusforsch.**, 1956, **7**, 28-35.
- 9.- Barski G., Lamy M. et Lépine P., Culture de cellules trypsinées de rein de lapin et leur application à l'étude des virus du groupe herpétique, **Ann. Inst. Pasteur**, 1955, **89**, 415-427.
- 10.- Baumeister J. et Miller C.A., The preparation of poliomyelitis complement-fixing antigens from infected tissue culture fluids, **J. inf. Dis.**, 1956, **98**, 27-32.
- 11.- Beveridge W.I.B. et Burnet F.M., The cultivation of viruses and

- rickettsiae in the chick-embryo, Med. Res. Council (London) Spec. Rept Ser. N° 256, 1946, 92 p.
- 12.- Beveridge W.I.B. et Burnet F.M., La culture des virus et des rickettsies dans l'embryon de poulet, trad. G. Cateigne, Ed. médicales Flammarion, Paris 1950, 164 p.
 - 13.- Black F.L., Growth and stability of measles virus, **Virology**, 1959, **7**, 184-192.
 - 14.- Black F.L. et Melnick J.L., The specificity of the complement fixation test in poliomyelitis, **Yale J. Biol. Med.**, 1954, **26**, 385-393.
 - 15.- Black F.L. et Melnick J.L., Microepidemiology of poliomyelitis and herpes B infections. Spread of the viruses within tissue cultures, **J. Immunol.**, 1955, **74**, 236-242.
 - 16.- Black F.L. et Melnick J.L., Appearance of soluble and cross-reactive complement-fixing antigens on treatment of poliovirus with formalin, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1955, **89**, 353-355.
 - 17.- Bradish C.J., Brooksby J.B., Dillon J.F. et Norambuena M., Ultra-centrifugal studies on the infective and complement-fixing components in the virus system of foot-and-mouth disease, **Proc. roy. Soc. B.**, 1952, **140**, 107-127.
 - 18.- Brenner S. et Horne R.W., A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses, **Biochim. biophys. Acta**, 1959, **34**, 103-110.
 - 19.- Brown J.A.H., Studies on the antigenic structure of herpes simplex virus, **Brit. J. exp. Path.**, 1953, **34**, 290-299.
 - 20.- Brown F. et Cartwright B., Fractionation of the virus of foot-and-mouth disease by chromatography on DEAE cellulose, **Biochim. biophys. Acta**, 1959, **33**, 344-346.
 - 21.- Brown F. et Stewart D.L., The influence of proflavine on the synthesis of foot-and-mouth disease virus. **J. gen. Microbiol.**, 1960, **23**, 369-379.
 - 22.- Burnet F.M., Principles of animal virology, 2nd ed. Academic Press Inc., New-York, 1960, 490 p.
 - 23.- Burnet F.M. et Lush D., The inactivation of herpes virus by immune sera : experiments using the chorioallantoic membrane technique, **J. Path. Bact.**, 1939, **48**, 275-286.

- 24.- Burnet F.M., Lush D. et Jackson A.V., The propagation of herpes, B and pseudorabies viruses on the chorioallantois, **Austr. J. exp. Biol. med. Sci.**, 1939, **17**, 35-40.
- 25.- Casals J., Acetone-ether extracted antigens for complement fixation with certain neurotropic viruses, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1949, **70**, 339-343.
- 26.- Casals J. et Olitzky P.K., A specific complement fixation test for poliomyelitis virus, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1950, **75**, 315-318.
- 27.- Casals J., Olitzky P.K. et Anslow R., A specific complement fixation test for infection with poliomyelitis virus, **J. exp. Med.**, 1951, **94**, 123-137.
- 28.- Ceolin G., Communication personnelle.
- 29.- Chany C., Un facteur inhibiteur de la multiplication intracellulaire des virus rappelant l'interféron, provenant de cellules cancéreuses. Le phénomène d'autoinhibition virale, **C.R. Acad. Sci.**, 1960, **250**, 3903-3905.
- 30.- Chany C., An interferon-like inhibitor of viral multiplication from malignant cells (the viral autoinhibition phenomenon), **Virology**, 1961, **13**, 485-492.
- 31.- Chany C., Daniel Ph. et Lépine P., Inhibition de la multiplication de **Poliovirus hominis** dans les cellules KB, préalablement infectées par **Myxovirus parainfluenzae** type III (souche EA 102), **C.R. Acad. Sci.**, 1960, **250**, 229-231.
- 32.- Colter J.S., Bird H.H., Moyer A.W. et Brown R.A., Infectivity of ribonucleic acid isolated from virus-infected tissues, **Virology**, 1957, **4**, 522-532.
- 33.- Coriell L.L., Blank H. et Scott T.F. Mc. N., Isolation of **herpes simplex** virus on the chorioallantoic membranes, **J. Lab. clin. Med.**, 1949, **34**, 402-408.
- 34.- Craigie J., The nature of the vaccinia flocculation reaction and observations on the elementary bodies of vaccinia, **Brit. J. exp. Path.**, 1932, **13**, 259-268.
- 35.- Crick F.H.C. et Watson J.D., Virus structure : general principles. In Ciba Foundation Symp. «The nature of the viruses», Churchill, London, 1957, 292 p.

- 36.- Daniel Ph., In Cours de cultures cellulaires du Service des Virus de l'Institut Pasteur.
- 37.- Daniel Ph. et Depoux R., La dispersion des cellules par trypsination à basse température, **Ann. Inst. Pasteur**, 1957, **92**, 703-704.
- 38.- Dawson J.R., Herpetic infection of the chorioallantoic membrane of the chick-embryo, **Amer. J. Path.**, 1933, **9**, 1-5.
- 39.- Delsal J.L., Lépine P. et Sautter V., Spectre chromatographique des virus poliomyélitiques : caractérisation des souches, **C.R. Acad. Sci.**, 1960, **251**, 290-291.
- 40.- Dudgeon J.A., A Complement fixation test for **herpes simplex** infections, **J. clin. Path.**, 1950, **3**, 239-247.
- 41.- Dulbecco R. et Vogt M., Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus, **J. exp. Med.**, 1954, **99**, 167-182.
- 42.- Eagle H., Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1955, **89**, 362-364.
- 43.- Enders J.F., Weller T.H. et Robbins F.C., Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues, **Science**, 1949, **109**, 85-87.
- 44.- Falke D., Siegert R. et Vogell W., Elektronenmikroskopische Befunde zur Frage der Doppelmembranbildung des **Herpes-simplex** virus, **Arch. ges. Virusforsch.**, 1959, **9**, 484-496.
- 45.- Farnham A.E., The formation of microscopic plaques by **herpes simplex** virus in HeLa cells, **Virology**, 1958, **6**, 317-327.
- 46.- Farnham A.E. et Newton A.A., The effect of some environmental factors on herpes virus grown in HeLa cells, **Virology**, 1959, **7**, 449-461.
- 47.- Finter N.B., Liu O.C. et Henlé W., Studies on host-virus in the chick embryo-influenza virus system. X. An experimental analysis of the von Magnus phenomenon, **J. exp. Med.**, 1955, **101**, 461-478.
- 48.- Fowler M., The demonstration of complement fixing antibodies to **herpes febrilis** virus, **Austr. J. exp. Biol. med. Sci.**, 1950, **28**, 339-342.
- 49.- Franklin R.M., The synthesis of fowl plague virus products in a proflavine-inhibited tissue culture system, **Virology**, 1958, **6**, 525-539.

- 50.- Gajdusek D.C., Robbins M.L. et Robbins F.C., Diagnosis of **herpes simplex** infections by the complement fixation test, **J. Amer. med. Ass.**, 1952, **149**, 235-240.
- 51.- Gard S., Résultats non publiés.
- 52.- Gessler A.E., Bender C.E., Parkinson M.C., I. A new and rapid method for isolating viruses by selective fluorocarbon deproteination, **Trans. N.Y. Acad. Sci.**, 1956, **18**, 701-703.
- 53.- Gey G.O., Coffman W.D. et Kubicek M.T., Tissue culture studies of the proliferating capacity of cervical carcinoma and normal epithelium, **Cancer Res.**, 1952, **12**, 264-265.
- 54.- Gierer A. et Schramm G., Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus, **Nature**, 1956, **177**, 702-703.
- 55.- Granoff A., Noninfectious forms of Newcastle disease and influenza viruses, **Virology**, 1955, **1**, 516-522.
- 56.- Grasset E., Bonifas V. et Pongratz E., Rapid slide precipitin micro-reaction of poliomyelitis antigens and antisera in agar, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1958, **97**, 72-77.
- 57.- Grasset N., Résultats à paraître.
- 58.- Gross W.O., Ortmann A. et Reissmann C., Virusstämme zweier getrennter Herpesausbrüche eines Patienten im serologischen Vergleich, **Z. Immun. Forsch**, 1956, **113**, 453-471.
- 59.- Guillot P., Exposé critique des principales méthodes de mesure des virus. Etude des virus de la fièvre aphteuse. Thèse, Faculté des Sciences, Paris, 1959, 110 p.
- 60.- Halonen P., Investigations on the virus of **herpes simplex**, **Ann. med. exp. et biol. fenniae**, 1955, **33**, suppl. 9, 79 p.
- 61.- Halonen P., Huebner R.J. et Turner H.C., Preparation of Echo complement fixing antigens in monkey kidney tissue culture and their purification by fluorocarbon, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1958, **97**, 530-537.
- 62.- Hanks J.H. et Wallace R.E., Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1949, **71**, 196-200.

- 63.- Hayward M.E., Serological studies with **herpes simplex virus**, **Brit. J. exp. Path.**, 1949, **30**, 520-529.
- 64.- Hayward M.E., Serological diagnosis of **herpes simplex** infections, **Lancet**, 1950, **258**, 856-858.
- 65.- Henlé G., Girardi A. et Henlé W., A non-transmissible cytopathogenic effect of influenza virus in tissue culture accompanied by formation of non-infectious hemagglutinin, **J. exp. Med.**, 1955, **101**, 25-41.
- 66.- Henlé G., Henlé W. et Harris S., The serological differentiation of mumps complement-fixation antigens, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1947, **64**, 290-295.
- 67.- Henlé W. et Henlé G., Studies on host-virus interactions in the chick embryo-influenza virus system. III. Development of infectivity, hemagglutination and complement fixation activities during the first infectious cycle, **J. exp. Med.**, 1949, **90**, 23-37.
- 68.- Henlé W. et Wiener M., Complement fixation antigens of influenza viruses type A and B, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1944, **57**, 176-179.
- 69.- Ho M. et Enders J.F., An inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures, **Proc. nat. Acad. Sci.**, 1959, **45**, 385-389.
- 70.- Ho M. et Enders J.F., Further studies on an inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures and its role in chronic viral infections, **Virology**, 1959, **9**, 446-477.
- 71.- Horne R.W. et Nagington J., Electron microscope studies of the development and structure of poliomyelitis virus, **J. mol. Biol.**, 1959, **1**, 333-338.
- 72.- Howes D.W. et Melnick J.L., The growth cycle of poliovirus in monkey kidney cells. I. Maturation and release of virus in monolayer cultures, **Virology**, 1957, **4**, 97-108.
- 73.- Hoyle L., An analysis of the complement-fixation reaction in influenza, **J. Hyg.**, 1945, **44**, 170-178.
- 74.- Hoyle L., The growth cycle of influenza virus A. A study of the relations between virus, soluble antigen and host cells, **Brit. J. exp. Path.**, 1948, **29**, 390-399.
- 75.- Hoyle L. et Fairbrother R.W., Antigenic structure of influenza viruses; the preparation of elementary body suspensions and the nature of the complement-fixing antigen, **J. Hyg.**, 1937, **37**, 512-520.

- 76.- Isaacs A., Particle counts and infectivity titrations for animal viruses, **Adv. Virus Res.**, 1957, **4**, 112-158.
- 77.- Isaacs A., Viral interference, In Virus growth and variation. 9th. Symp. Soc. gen. Microbiol., Cambridge University Press, 1959, 272 p.
- 78.- Isaacs A. et Burke D.C., Viral interference and interferon, **Brit. med. Bull.**, 1959, **15**, 185-188.
- 79.- Isaacs A. et Fulton F., Interference in the chick chorion, **J. gen. Microbiol.**, 1953, **9**, 132-139.
- 80.- Isaacs A. et Lindenmann J., Virus interference. I. Interferon, **Proc. Roy. Soc. B.**, 1957, **147**, 258-267.
- 81.- Jawetz E., Coleman V.R. et Allende M.F., Studies on **herpes simplex** virus. II. A soluble antigen of herpes virus possessing skin-reactive properties, **J. Immunol.**, 1951, **67**, 197-205.
- 82.- Jawetz E., Coleman V.R. et Merrill E.R., Studies of **herpes simplex** virus. VII. Immunological comparison of strains of **herpes simplex**, **J. Immunol.**, 1955, **75**, 28-34.
- 83.- Kaplan A.S., A study of the **herpes simplex** virus-rabbit kidney cell system by the plaque technique, **Virology**, 1957, **4**, 435-457.
- 84.- Kilbourne E.D. et Horsfall F.L., Studies of **herpes simplex** virus in newborn mice, **J. Immunol.**, 1951, **67**, 321-329.
- 85.- Kipps A., Naudé W. du T., Polson A., Selzer G. et van den Ende M., The size distribution of specific antigens in virus-infected tissues and their significance, In Ciba Found. Symp., 1957, 224-248, Churchill, London.
- 86.- Klug A. et Caspar D.L.D., The structure of small viruses, **Adv. Virus Res.**, 1960, **7**, 225-325.
- 87.- Le Bouvier G.L., Observations on the poliomyelitis complement-fixation test, **Brit. J. exp. Path.**, 1953, **36**, 300-318.
- 88.- Le Bouvier G.L., Poliovirus precipitins. A study by means of diffusion agar, **J. exp. Med.**, 1957, **106**, 661-675.
- 89.- Le Bouvier G.L., Poliovirus D and C antigens : their differentiation and measurement by precipitation in agar, **Brit. J. exp. Path.**, 1959, **40**, 452-463.

- 90.- Le Bouvier G.L., Schwerdt C.E. et Schaffer F.L., Specific precipitates in agar with purified poliovirus, **Virology**, 1957, **4**, 590-593.
- 91.- Lebrun J., Cellular localization of **herpes simplex** virus by means of fluorescent antibody, **Virology**, 1956, **2**, 496-510.
- 92.- Lebrun J., L'antigène poliomyélitique au cours du développement intracellulaire du virus, **Ann. Inst. Pasteur**, 1957, **93**, 225-229.
- 93.- Ledermann S., Notions pratiques de statistique à l'usage du corps médical, Suppl. du Concours Médical n° 25, juin 1956, 63 p.
- 94.- Ledinko N., Production of noninfectious complement-fixing poliovirus particles in HeLa cells treated with proflavine, **Virology**, 1958, **6**, 512-524.
- 95.- Lépine P., Artzet F. et Ceolin G., Conservation du virus herpétique, **Ann. Inst. Pasteur**, 1960, **98**, 750-753.
- 96.- Lépine P., Daniel Ph., Pelmont J. et Slizewicz P., Besoins nutritifs des cellules rénales de singe et des cellules de la souche HeLa cultivées *in vitro*, **Ann. Inst. Pasteur**, 1957, **92**, 567-575.
- 97.- Lépine P., Sautter V., Delpy J. et Artzet F., Technique de la déviation du complément sur plaques dans les maladies à virus. Application aux virus du groupe Coxsackie, **Ann. Inst. Pasteur**, 1953, **84**, 684-694.
- 98.- Lieberman M. et Friedman M., Growth characteristics of adenoviruses, I. Production and release of complement fixing antigen and infectious virus, **J. Immunol.**, 1959, **82**, 1-8.
99. Lippelt H. et Söltz-Szöts J., Serologische Studien zum **Herpes-simplex** Problem, **Arch. ges. Virusforsch.**, 1959, **9**, 127-134.
- 100.- Lwoff A., Anderson T.F. et Jacob F., Remarques sur les caractéristiques de la particule virale infectieuse, **Ann. Inst. Pasteur**, 1959, **97**, 281-289.
101. Lwoff A., Dulbecco R., Vogt M. et Lwoff M., Kinetics of the release of poliomyelitis virus from single cells, **Virology**, 1955, **1**, 128-139.
102. von Magnus P., Propagation of the PR8 strain of influenza A virus in chick embryo. II. The formation of incomplete virus following inoculation of large doses of seed virus, **Acta path. microbiol. scand.**, 1951, **28**, 278-293.

103. Markham R. et Smith K.M., Studies on the virus of turnip yellow mosaic, **Parasitology**, 1949, **39**, 330-342.
- 104.-Maurin J., Virat J. et Carré M.C., Etude des virus entériques de l'homme. Isolement, identification et recherches sérologiques en 1958, **Ann. Inst. Pasteur**, 1960, **98**, 211-225.
- 105.- Mayer M.M., Osler A.G., Bier O.G. et Heidelberger M., The activating effect of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement, **J. exp. Med.**, 1946, **84**, 535-548.
- 106.- Mayer M.M., Rapp H.J., Roizman B., Klein S.W., Cowan K.M., Lukens D., Schwerdt C.E., Schaffer F.L. et Chamey J., The purification of poliomyelitis virus as studied by complement fixation, **J. Immunol**, 1957, **78**, 435-455.
- 107.- Morgan C., Ellison S.A., Rose H.M. et More D.H., Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. I. **Herpes simplex** virus. **J. exp. Med.**, 1954, **100**, 195-202.
- 108.- Morgan C., Rose H.M., Holden M. et Jondes E.P., Electron microscopic observations of the development of **herpes simplex** virus, **J. exp. Med.**, 1959, **110**, 643-656.
- 109.- Munk K. et Ackermann W.W., Some properties of **herpes simplex** virus, **J. Immunol.** 1953, **71**, 426-430.
- 110.- Nadel M.K. et Eisenstark A., Evidence of the existence of «incomplete» Newcastle disease virus, **J. Bact.**, 1955, **69**, 173-176.
- 111.- Newton A.A. et Stoker M.G.P., Changes in nucleic acid content of HeLa cells infected with herpes virus, **Virology**, 1958, **5**, 549-560.
- 112.- Osterhout S. et Tamm I., Measurement of **herpes simplex** virus by the plaque technique in human amnion cells, **J. Immunol.**, 1959, **83**, 442-447.
- 113.- Paucker K. et Henlé W., Studies on host-virus interactions in the chick embryo-influenza virus system. XI. The effect of partial inactivation of standard seed virus at 37° upon the progeny, **J. exp. Med.**, 1955, **101**, 479-492.
- 114.- Paucker K. et Henlé W., Studies on host-virus interactions in the chick embryo-influenza virus system. XII. Further analyses of yields derived from heat inactivated standard seeds, **J. exp. Med.**, 1955, **101**, 493-506.

- 115.- Pelmont J. et Morgan H.R., Facteurs nutritifs influençant la croissance du virus de l'herpès dans la souche de cellules L de Earle, **Ann. Inst. Pasteur**, 1959, **96**, 448-454.
- 116.- Pereira H.G., A virus inhibitor produced in HeLa cells infected with adenovirus, **Virology**, 1960, **11**, 590-602.
- 117.- Peterson E.A. et Sober H.A., Chromatography of proteins. I. Cellulose ion exchange adsorbents, **J. Amer. chem. Soc.**, 1956, **78**, 751-756.
- 118.- Philipps H.J. et Terryberry J.E., Counting actively metabolizing tissue cultured cells, **Exp. Cell. Res.**, 1957, **13**, 341-347.
- 119.- Polatnick J., Studies on the small particle complement-fixing antigen of foot-and-mouth disease virus, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1960, **103**, 27-31.
- 120.- Pollard M., Preparation of specific complement-fixing antigen with Lansing poliomyelitis virus, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1951, **78**, 388-392.
- 121.- Pollard M., Hsiang C.M. et Sharp G.R., Preparation of specific complement-fixing antigens from the three prototypes of poliomyelitis viruses, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1952, **79**, 48-50.
- 122.- Polley J.R., Preparation of a stable non-infective complement-fixing antigen for herpes simplex, **Canad. J. Microbiol.**, 1960, **6**, 515-518.
- 123.- Polley J.R., Preparation of non-infective soluble antigens with gamma radiation, **Canad. J. Microbiol.**, 1961, **7**, 135-139.
- 124.- Randrup A., Physico-chemical and immunological studies on the virus of foot-and-mouth disease and its host tissue microsomes, **Acta path. microbiol. Scand.**, 1957, supp. 120, 68 p.
- 125.- Rappaport C., Trypsinization of monkey kidney tissue : an automatic method for the preparation of cell suspensions, **Bull. World Health Organization**, 1956, **14**, 147-166.
- 126.- Reed J.L. et Muench H., A simple method of estimating 50 per cent end-points, **Amer. J. Hyg.**, 1938, **27**, 493-497.
- 127.- Robba L. et Virat J., Préparation d'antigènes pour la déviation du complément dans le diagnostic sérologique des affections à virus Cocksackie groupe B, **Ann. Inst. Pasteur**, 1960, **99**, 784-791.

128. Roizman B., Höpken W. et Mayer M.M., Immunochemical studies of poliovirus, II. Kinetics of the formation of infectious and non-infectious type I poliovirus in three cell strains of human derivation, **J. Immunol.**, 1958, **80**, 336-395.
129. Roizmann B., Rapp H.J. et Mayer M.M., Fractionation and alteration of complement fixing poliovirus antigens, **Fed. Proc.**, 1957, **16**, 1850.
130. Roux E., Sur les microbes dits «invisibles», **Bull. Inst. Pasteur**, 1903, **1**, 7-12.
131. Rubin H., Baluda M. et Hotchin J.E., The maturation of Western equine encephalomyelitis virus and its release from chick-embryo cells in suspension, **J. exp. Med.**, 1955, **101**, 205-212.
132. Rustigian R., Havens P. et Kolner M., Possible occurrence of multiple antigens in type 2 poliomyelitis and GD VII mouse encephalomyelitis viruses, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1954, **86**, 500-504.
133. Salk J.E., Lewis L.J., Youngner J.S., et Bennet B.L., The use of adjuvants to facilitate studies on the immunological classification of poliomyelitis viruses, **Amer. J. Hyg.**, 1951, **54**, 157-173.
134. Sanford K.K., Earle W.R., Evans V.J., Waltz H.K., et Shannon J.E., The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei, **J. nat. Cancer Inst.**, 1951, **11**, 773-795.
135. Schäfer W., Munk K. et Mussgay M., Physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften des gereinigten «löslichen Antigens» der klassischen Geflügelpest, **Z. Naturforsch.**, 1956, **11b**, 330-338.
136. Schlesinger R.W., Incomplete growth cycle of influenza virus in mouse brain, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1950, **74**, 541-548.
137. Schmidt N.J. et Lennette E.H., Modification of the homotypic specificity of poliomyelitis complement-fixing antigens by heat, **J. exp. Med.**, 1956, **104**, 99-120.
138. Schmidt N.J. et Lennette E.H., An inquiry into the use of the complement fixation test for the typing of poliomyelitis viruses, **Amer. J. Hyg.**, 1957, **66**, 119-130.
139. Schmidt N.J., Lennette E.H., Doleman J.H. et Hagens S.J., Factors influencing the potency of poliomyelitis complement-fixing antigens produced in tissue culture systems, **Amer. J. Hyg.**, 1957, **66**, 1-19.

- 140.- Schmidt N.J., Lennette E.H. et Shon C.W., A complement fixing antigen for **herpes simplex** derived from chick-embryo tissue cultures, **Amer. J. Hyg.**, 1960, **72**, 59-72.
- 141.- Schwerdt C.E., Physical and chemical characteristics of purified poliomyelitis virus, **Spec. Pub. N.Y. Acad. Sci.**, 1957, **5**, 157-166.
- 142.- Schwerdt C.E. et Schaffer F.L., Some physical and chemical properties of purified poliomyelitis virus preparations, **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 1955, **61**, 740-753.
- 143.- Scott L.V., Felton F.G. et Barney J.A., Hemagglutination with **herpes simplex** virus, **J. Immunol.**, 1957, **78**, 211-213.
- 144.- Scott T.F.McN., Burgoon C.F., Coriell L.L. et Blank H., The growth curve of the virus of **herpes simplex** in rabbit corneal cells grown in tissue culture with parallel observations on the development of the intranuclear inclusion body, **J. Immunol.**, 1953, **71**, 385-395.
- 145.- Scott T.F.McN., Coriell L.L., Blank H. et Gray A., The growth curve of the virus of **herpes simplex** on the chorioallantoic membrane of the embryonated hen's egg, **J. Immunol.**, 1953, **71**, 134-144.
- 146.- Selzer G. et van den Ende M., Further experiments with the soluble antigen of the MEF 1 poliomyelitis virus, **J. Hyg.**, 1956, **54**, 1-7.
- 147.- Selzer G. et Polson A., Dispersion analyses of the MEF 1 strain of poliomyelitis virus, **Biochim. biophys. Acta.**, 1954, **15**, 251-257.
- 148.- Smith W., Lee L.H., Sheffield W. et Churcher G., A specific virus-antibody flocculation reaction with poliomyelitis viruses, **Lancet**, 1956, **270**, 710-713.
- 149.- Sohier R., Peillard M.M. et Chardonnet Y., La réaction de fixation du complément pour le diagnostic de l'infection herpétique. I. Antigènes préparés à partir de liquides amniotiques et allantoïques infectés, **Ann. Inst. Pasteur**, 1955, **89**, 489-504.
- 150.- Söltz-Szöts J., Zur Serologie des **Herpes simplex**, **Zbl. Bakt., I. Orig.**, 1959, **176**, 406-409.
- 151.- Sosa-Martinez J. et Lennette E., Studies on a complement fixation test for **herpes simplex**, **J. Bact.**, 1955, **70**, 205-215.
- 152.- Stoker M.G.P., Mode of intercellular transfer of herpes virus, **Nature**, 1958, **182**, 1525-1526.

- 153.- Stoker M.G.P., Growth studies with herpes virus. In Virus growth and variation. 9th Symp. Soc. Gen. Microbiol., Cambridge University Press. 1959, 272 p.
- 154.- Stoker M.G.P. et Ross R.W., Quantitative studies on the growth of herpes virus in HeLa cells, **J. Gen. Microbiol.**, 1958, **19**, 250-266.
- 155.- Stoker M.G.P., Smith K. et Ross R.W., Electron microscope studies of HeLa cells infected with herpes virus, **J. gen. Microbiol.**, 1958, **19**, 244-249.
- 156.- Sureau P., Etude sur les virus à Madagascar en 1960, **Arch. Inst. Pasteur Madagascar**, 1961, **29**, 25-43.
- 157.- Svedmyr A., Enders J.F. et Holloway A., Complement fixation with Brunhilde and Lansing poliomyelitis viruses propagated in tissue cultures, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1952, **79**, 296-300.
- 158.- Taverne J. et Wildy P., Purification of herpes simplex virus by chromatography of calcium phosphate, **Nature**, 1959, **21**, 1655-1656.
- 159.- Thomas J.A. et Leclerc J., L'acide ribonucléique infectieux du virus de la fièvre aphteuse, **C.R. Acad. Sci.**, 1959, **248**, 606-609.
- 160.- Thomas J.A. et Leclerc J., Sur le pouvoir infectieux et sur quelques propriétés de l'acide ribonucléique extrait du virus de la fièvre aphteuse, **Bull. Off. intern. Epizooties**, 1960, **53**, 1328-1347.
- 161.- Uhlendorf B.W., The intracellular synthesis and maturation of a viral precursor. Thesis, University of Michigan 1957, 117 p.
- 162.- Volkert M. et Christensen P.M., Two ornithosis complement-fixing antigens from infected yolk-sacs. I. The phosphatide antigen, the virus antigen and methods for their preparation, **Acta path. microbiol. scand.**, 1955, **37**, 211-218.
- 163.- Waterson A.P., Plaque formation by herpes virus in chick embryo tissue, **Arch. ges. Virusforsch.**, 1958, **8**, 592-599.
- 164.- Whitney H., Tissue culture studies of herpes simplex virus, **Ann. Rep. Div. Lab. Res.**, 1956, 41-42.
- 165.- Wildy P., The growth of herpes simplex virus, **Austr. J. exp. Biol. med. Sci.**, 1954, **32**, 605-619.
- 166.- Wildy P. et Holden H.F., The complement fixing antigen of herpes simplex virus, **Austr. J. exp. Biol. med. Sci.**, 1954, **32**, 621-632.

- 167.- Wildy P., Russell W.C. et Horne R.W., The morphology of herpes virus, **Virology**, 1960, **12**, 204-222.
- 168.- Wildy P., Stoker M.G.P. et Ross R.W., Release of herpes virus from solitary HeLa cells, **J. gen. Microbiol.**, 1959, **20**, 105-112.
- 169.- Womack C.R. et Hunt B.P., Serologic differences in strains of **herpes simplex** virus, **Science**, 1954, **120**, 227-228.
- 170.- Youngner J.S., Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells, **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 1954, **85**, 202-205.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

«Le phénomène d'interférence dans les infections virales»

Vu et approuvé :

Paris, le 26 Novembre 1961

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. ZAMANSKY

Vu

et Permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie
de Paris,**

Jean ROCHE

